



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas
poliméricas contendo extratos de própolis e avaliação de
suas atividades biológicas em células de câncer de próstata**

ANDRÉIA MARINCEK LUZENTI

**Ribeirão Preto
2022**



ANDRÉIA MARINCEK LUZENTI

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo extratos de própolis e avaliação de suas atividades biológicas em células de câncer de próstata

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador (a): Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 28/04/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Luzenti, Andréia Marincek

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo extratos de própolis e avaliação de suas atividades biológicas em células de câncer de próstata. Ribeirão Preto, 2022.

123 p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador (a): Marcato, Priscyla Daniely.

1. Nanopartículas. 2. Câncer. 3. Própolis.

Nome do autor: LUZENTI, Andréia Marincek

Título do trabalho: Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo extratos de própolis e avaliação de suas atividades biológicas em células de câncer de próstata

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus por me guiar, pelas oportunidades e o seu amor infinito.

Aos meus pais e irmãos por todo o amor, amparo e cuidado que tiveram comigo ao longo da minha vida.

Ao meu marido pelo amor e carinho com que tem me acompanhado nos últimos anos e por me apoiar e encorajar sempre.

À Profa. Dra. Priscyla D. Marcato Gaspari pela confiança na minha capacidade, por me incentivar e pelo carinho com que me recebeu em seu grupo de pesquisa.

À técnica Tais N. Chrysostomo Massaro pela paciência, o suporte e a amizade.

Aos amigos e colegas de trabalho Ivana Carvalho, Letícia Prado, Fernando Beserra, Rogério Benati, Cristiane Chedraoui, e em especial à Letícia Bueno, Caroline Botteon, Isabela Araújo, Iasmin Ferreira e Bianca Fontanezi pela parceria, troca de conhecimentos e companheirismo tanto nas dificuldades quanto nas alegrias.

Aos grupos de pesquisa parceiros pela gentileza e apoio nos experimentos realizados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPESP pela oportunidade e apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“O essencial é invisível aos olhos.” (Saint-Exupéri, A., 1943)

RESUMO

LUZENTI, A. M. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo extratos de própolis e avaliação de suas atividades biológicas em células de câncer de próstata.** 2022. 123 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

O câncer de próstata é o sexto tipo com maiores índices de mortalidade na população mundial masculina. O tratamento para esse tipo de câncer pode levar a alterações fisiológicas que prejudicam a qualidade de vida dos pacientes e, por esse motivo, novos compostos têm sido estudados como substitutos ao tratamento convencional. A própolis tem mostrado atividade citotóxica frente a vários tipos de câncer, sendo as de maior interesse no Brasil a própolis verde (PV) e a própolis vermelha brasileira (PVB). O uso terapêutico da própolis é limitado devido à reduzida biodisponibilidade de grande parte de seus compostos, sendo a nanoencapsulação destes uma estratégia para superar essas limitações. Os objetivos deste trabalho foram o desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas contendo PV (NC-PV) ou PVB (NC-PVB) e avaliação da sua atividade biológica em células de câncer de próstata. Para isso, extratos de PV ou PVB foram encapsulados em estruturas do tipo nanocápsulas, sendo o seu método de obtenção otimizado por planejamento experimental *Box-Behnken Design*, avaliando a influência das concentrações de polímero, óleo e tensoativo no diâmetro e índice de polidispersão (PdI) das nanoestruturas. As NC-PV e NC-PVB apresentaram diâmetros de 201 e 183 nm, respectivamente, baixo PdI, potencial zeta negativo e pH entre 3 e 4. A eficiência de encapsulamento dos marcadores de ambos os extratos determinada por UPLC/MS foi superior a 98%, com exceção do ácido cumárico (43%). Os nanocarreadores apresentaram forma esférica, estabilidade no período avaliado (120 dias) e um perfil de liberação *in vitro* dos compostos majoritários controlado especialmente por mecanismos de erosão e difusão. Os ensaios de citotoxicidade conduzidos em células de câncer de próstata PC-3 indicaram uma maior atividade citotóxica dos extratos livre e encapsulado de PVB em comparação aos de PV; além disso, a NC-PV apresentou citotoxicidade superior ao extrato de PV, enquanto a NC-PVB e PVB demonstraram citotoxicidades semelhantes. Dessa forma, os resultados obtidos indicam que as formulações de nanocápsulas desenvolvidas constituem um sistema favorável ao encapsulamento dos extratos de PV e PVB com potencial aplicação em terapias contra o câncer. Palavras-chave: Nanopartículas. Câncer. Própolis.

ABSTRACT

LUZENTI, A. M. **Development and characterization of polymeric nanoparticles containing propolis extracts and evaluation of their biological activities in prostate cancer cells.** 2022. 123 p. Dissertation (Master) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Prostate cancer is the sixth type with the highest mortality rates in the male population worldwide. The treatment for this type of cancer can lead to physiological changes that impair the quality of life of patients and, for this reason, new compounds have been studied as substitutes for conventional treatment. Propolis has shown cytotoxic activity against several types of cancer, the most interesting in Brazil being green propolis (GP) and Brazilian red propolis (BRP). The therapeutic use of propolis is limited due to the reduced bioavailability of most of its compounds and their nanoencapsulation is a strategy to overcome these limitations. The goals of this work were the development and characterization of nanocapsules containing GP (GP-NC) or BRP (BRP-NC) and evaluation of their biological activity in prostate cancer cells. For this, GP or BRP extracts were encapsulated in nanocapsules and their preparation method was optimized by an experimental design, Box Behnken Design, evaluating the influence of Polymer, oil and surfactant concentrations on the diameter and polydispersity index (PdI) of nanostructures. GP-NC and BRP-NC had diameters of 201 and 183 nm, respectively, low PdI, negative zeta potential and pH around 3 and 4. The encapsulation efficiency of the markers of both extracts determined by UPLC-MS was higher than 98%, with the exception of coumaric acid (43%). The nanocarriers showed a spherical shape, stability in the evaluated period (120 days) and a release profile controlled specially by erosion and diffusion mechanisms. Cytotoxicity assays conducted on PC-3 prostate cancer cells indicated greater cytotoxic activity of free and encapsulated BRP extracts compared to GP; also, GP-NC showed superior cytotoxicity in relation to GP, while BRP-NC and BRP had similar cytotoxicities. Thus, the results obtained indicate that the nanocapsule formulations developed constitute a favourable system for the encapsulation of GP and BRP extracts with a potential application in intravenous therapies against cancer.

Keywords: Nanoparticles. Cancer. Propolis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Estruturas da próstata humana normal..... | 3 |
| Figura 2 - Própolis verde | 7 |
| Figura 3 - Estrutura básica dos ácidos hidroxicinâmicos | 7 |
| Figura 4 - Própolis vermelha brasileira | 8 |
| Figura 5 – Estruturas químicas básicas dos isoflavonoides e benzofenonas..... | 8 |
| Figura 6 - Nanopartículas poliméricas..... | 10 |
| Figura 7- Estrutura química do poli (ácido lático) – PLA..... | 11 |
| Figura 8 – Estrutura química de um poloxâmero | 13 |
| Figura 9 - Mecanismos de estabilidade de nanoestruturas em solução | 13 |
| Figura 10 – Estrutura química dos três padrões utilizados no desenvolvimento do método para análise da eficiência de encapsulamento da PV por UPLC-MS..... | 21 |
| Figura 11 - Estrutura química dos padrões utilizados para análise da eficiência de encapsulamento da PVB por UPLC-MS | 25 |
| Figura 12 – Sistema utilizado para a determinação do perfil de liberação de artepelin C e formononetina a partir das nanocápsulas contendo os extratos de própolis verde e vermelha brasileira (NC-PV e NC-PVB) | 28 |
| Figura 13 - Reação de complexação entre quercetina (flavonoide) e o íon alumínio (Al^{3+}).... | 32 |
| Figura 14 - Espectro de absorção das soluções de quercetina em etanol e metanol (A) e quercetina e solução de cloreto de alumínio em etanol e metanol (B)..... | 34 |
| Figura 15 - Avaliação da presença de cristais em amostra de própolis vermelha brasileira nos óleos Miglyol® 810 (A), ácido oleico (B) e tributirina (C) | 39 |
| Figura 16 - Avaliação da presença de cristais em amostra de própolis verde nos óleos Miglyol® 810 (A), ácido oleico (B) e tributirina (C)..... | 39 |
| Figura 17 – Gráficos de diâmetro por intensidade das nanocápsulas preparadas com 1% de Pluronic® F68 (curvas vermelhas) ou Kolliphor® P 407 (curvas verdes) contendo extrato de própolis vermelha brasileira (A) ou própolis verde (B) | 40 |
| Figura 18- Influência da concentração dos componentes da formulação contendo própolis vermelha brasileira | 43 |
| Figura 19 - Influência da concentração dos componentes da formulação contendo própolis verde | 43 |
| Figura 20 – Gráficos de superfície obtidos através do planejamento experimental para própolis vermelha brasileira | 44 |

| | |
|---|----|
| Figura 21 - Gráficos de superfície obtidos através do planejamento experimental para própolis verde | 44 |
| Figura 22 - Termogramas dos extratos livres e encapsulados de PV e PVB, NC-B, PLA e Kolliphor® P407 | 46 |
| Figura 23 – Gráficos de concentração (nanopartículas/mL) por tamanho (nm) das amostras de nanocápsulas sem extrato (A) e com extratos de própolis verde (B) ou vermelha brasileira (C) | 48 |
| Figura 24 – Imagens das nanocápsulas contendo extrato de própolis vermelha brasileira (A e B) e verde (C e D) obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão | 50 |
| Figura 25 – Cromatogramas de artemelin C (t_r 3,38) (A), bacarina (t_r 3,43) (B) e ácido cumárico (t_r 1,18) (C) | 51 |
| Figura 26 - Cromatogramas do filtrado de suspensão de nanocápsulas sem própolis em seus respectivos SIR: A - 299 (artepelin C – t_r 3,38); B - 363 (bacarina – t_r 3,43); e C - 163 (ácido cumárico – t_r 1,18)..... | 54 |
| Figura 27 - Curvas de calibração dos padrões artemelin C, bacarina e ácido cumárico | 55 |
| Figura 28 - Gráfico de distribuição de resíduos dos padrões artemelin C (A), bacarina (B) e ácido cumárico (C)..... | 56 |
| Figura 29 - Gráfico de Efeitos Principais das médias das áreas e tempos de retenção (t_r) para artemelin C, bacarina e ácido cumárico avaliados na robustez do método analítico | 62 |
| Figura 30 - Cromatogramas do filtrado de suspensão de nanocápsulas sem própolis em seus respectivos SIR: 267 (formononetina – t_r 2,98) (A); 283 (biochanina A – t_r 3,26) (B); e 271 (vestitol – t_r 2,97) (C) | 64 |
| Figura 31 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas sem própolis (NC-B) e contendo extratos de própolis verde (NC-PV) e vermelha brasileira (NC-PVB) em função do tempo .. | 65 |
| Figura 32 –Índice de polidispersão (PdI) obtidos nas análises das nanopartículas sem própolis (NC-B) e contendo extratos de própolis verde (NC-PV) e vermelha brasileira (NC-PVB) em função do tempo | 66 |
| Figura 33 –Potencial zeta (mV) das nanopartículas sem própolis (NC-B) e contendo extratos de própolis verde (NC-PV) e vermelha brasileira (NC-PVB) em função do tempo..... | 66 |
| Figura 34 – pH das formulações de nanopartículas sem própolis (NC-B) e contendo extratos de própolis verde (NC-PV) e vermelha brasileira (NC-PVB) em função do tempo..... | 67 |
| Figura 35 - Eficiência de encapsulamento do extrato de própolis verde..... | 67 |
| Figura 36 - Eficiência de encapsulamento do extrato de própolis vermelha Brasileira | 67 |

| | |
|--|----|
| Figura 37 – Cromatogramas de solução tampão fosfato 0,03M pH 7,4 com 0,5% de Tween®80 em SIR 299 (artepelin C – t _r 3,38) e com 0,2% de Tween®80 em SIR 267 (formononetina – t _r 2,99)..... | 70 |
| Figura 38 – Perfil de liberação de artemelin C (NC-PV) e formononetina (NC-PVB) a partir de nanocápsulas contendo extratos de própolis verde ou vermelha brasileira | 71 |
| Figura 39 – Degradação e intumescimento do polímero em nanopartícula polimérica | 72 |
| Figura 40 - Mecanismos de difusão de fármaco pela membrana ou matriz de nanopartículas poliméricas | 73 |
| Figura 41 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com extrato de própolis verde livre (PV) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PV) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24 (A) e 48h (B) | 75 |
| Figura 42 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com extrato de própolis vermelha brasileira livre (PVB) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PVB) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24 (A) e 48h (B) | 76 |
| Figura 43 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com nanocápsulas vazias (NC-B) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24 (A) e 48h (B) | 76 |
| Figura 44 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com extrato de própolis verde livre (PV) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PV) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24h | 77 |
| Figura 45 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com extrato de própolis vermelha brasileira livre (PVB) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PVB) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24h | 77 |
| Figura 46 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com nanocápsulas vazias (NC-B) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24h..... | 78 |
| Figura 47 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com extrato de própolis verde livre (PV) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PV) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24 (A) e 48h (B) | 80 |
| Figura 48 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com extrato de própolis vermelha brasileira livre (PVB) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PVB) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24 (A) e 48h (B) | 80 |
| Figura 49 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com nanocápsulas vazias (NC-B) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24 (A) e 48h (B) | 81 |

| | |
|---|----|
| Figura 50 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com extrato de própolis verde livre (PV) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PV) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24h..... | 81 |
| Figura 51 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com extrato de própolis vermelha brasileira livre (PVB) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PVB) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24h..... | 82 |
| Figura 52 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com nanocápsulas vazias (NC-B) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24h..... | 82 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Variáveis independentes utilizadas no processo de otimização de formulação por Box Behnken Design | 18 |
| Tabela 2 – Variáveis utilizadas para a determinação da robustez por planejamento fatorial geral | 24 |
| Tabela 3 – Tempo de retenção, massa molar e razão massa carga dos padrões formononetina, biochanina A e bacarina | 25 |
| Tabela 4 – Equações e gráficos para avaliação do melhor modelos cinético aplicados ao perfil de liberação de artepelin C e formononetina a partir das nanocápsulas contendo os extratos de própolis verde e vermelha brasileira (NC-PV e NC-PVB)..... | 28 |
| Tabela 5 - Médias das absorbâncias obtidas para concentrações de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$ após 5, 15 e 30 min. de reação entre quercetina e alumínio e análise estatística por ANOVA com pós teste de Tukey | 35 |
| Tabela 6 - Valores de EC50 para o controle positivo (ácido ascórbico) e as amostras de própolis | 37 |
| Tabela 7 - Variáveis dependentes e independentes das formulações contendo extrato de própolis verde propostas durante o planejamento experimental..... | 41 |
| Tabela 8 - Variáveis dependentes e independentes das formulações contendo extrato de própolis vermelha brasileira propostas durante o planejamento experimental..... | 42 |
| Tabela 9 - Z-average, PdI e potencial zeta médios das nanocápsulas com e sem própolis | 45 |
| Tabela 10 – Valores de temperatura e variação de entalpia (ΔH) das amostras analisadas por DSC | 47 |
| Tabela 11 – Diâmetro (nm), concentração (partículas/mL) e índice de Span das amostras de nanocápsulas analisadas pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA) | 48 |
| Tabela 12 – Parâmetros do espectrômetro de massas para os padrões artepelin C, bacarina e ácido cumárico..... | 52 |
| Tabela 13 - Gradiente de eluição utilizado na metodologia desenvolvida por UPLC-MS | 52 |
| Tabela 14 - Repetibilidade e precisão intermediária calculadas em termos de Coeficiente de Variação (CV) e análise estatística por teste de T para os padrões artepelin C, bacarina e ácido cumárico | 57 |
| Tabela 15 - Exatidão calculada para os padrões artepelin C, bacarina e ácido cumárico | 58 |
| Tabela 16 - Limites de detecção e quantificação para artepelin C, bacarina e ácido cumárico..... | 59 |
| Tabela 17 - Parâmetros avaliados na robustez do método para artepelin C | 60 |

| | |
|---|----|
| Tabela 18 - Parâmetros avaliados na robustez do método para bacarina | 60 |
| Tabela 19 - Parâmetros avaliados na robustez do método para ácido cumárico | 61 |
| Tabela 20 - Concentração dos analitos artepelin C e formononetina obtidas por UPLC-MS nos diferentes meios de dissolução | 69 |
| Tabela 21 – Valores de R^2 obtidos a partir da análise dos perfis de liberação de artepelin C e formononetina por diferentes modelos matemáticos..... | 72 |
| Tabela 22 - Valores de IC_{50} e concentração em partículas/mL para os extratos de própolis livre e encapsulados em ensaio de viabilidade celular de células PC-3 por captura do corante vermelho neutro..... | 74 |
| Tabela 23 - Valores de IC_{50} e concentração em partículas/mL para os extratos de própolis livre e encapsulados em ensaio de viabilidade celular de células 3T3 por captura do corante vermelho neutro | 75 |
| Tabela 24 - Valores de IC_{50} e concentração em partículas/mL para os extratos de própolis livre e encapsulados em ensaio de viabilidade celular de células PC-3 por quantificação de dupla fita de DNA..... | 79 |
| Tabela 25 - Valores de IC_{50} e concentração em partículas/mL para os extratos de própolis livre e encapsulados em ensaio de viabilidade celular de células 3T3 por quantificação de dupla fita de DNA..... | 79 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| µg | Micrograma (s) |
| µL | Microlitro (s) |
| µM | Micromolar |
| Al ³⁺ | Íon alumínio |
| ANOVA | Análise de variância |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BCRJ | Banco de células do Rio de Janeiro |
| BEH | <i>Ethylene Bridged Hybrid</i> |
| C18 | Hidrocarboneto formado por 18 carbonos |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| DLS | <i>Dynamic Light Scaterring</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DPPH | 2,2-difenil-1- picril-hidrazil |
| DSC | <i>Differential Scanning Calorimetry</i> |
| dsDNA | <i>Double-stranded deoxyribonucleic acid</i> |
| EC ₅₀ | Metade da Concentração de Resposta Máxima |
| ELS | <i>Eletrophoretic Light Scaterring</i> |
| ESI | <i>Eletrospray</i> |
| FAPESP | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo |
| FCFRP | Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| h | Hora (s) |
| IC ₅₀ | Metade da Concentração Inibitória Máxima |
| ICH | <i>International Council of Harmonization</i> |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| ISO | <i>International Organization for Standardization</i> |
| KCl | Cloreto de potássio |
| L | Litro (s) |
| Log P | Logaritmo do coeficiente de partição octanol/ água |
| Log | Logaritmo |

| | |
|----------------|---|
| m/v | Quantidade de massa (g) em 100 mL de solvente |
| m/z | Razão massa carga |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MET | Microscopia Eletrônica de Transmissão |
| mg | Miligrama (s) |
| min. | Minuto (s) |
| mL | Mililitro (s) |
| Mm | Milímetro (s) |
| mM | Milimolar |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NC-B | Nanocápsula sem própolis |
| NC-PV | Nanocápsula carregada com própolis verde |
| NC-PVB | Nanocápsula carregada com própolis vermelha brasileira |
| ng | Nanogramas |
| nm | Nanometros |
| NTA | <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i> |
| °C | Grau (s) Celsius |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PdI | Índice de polidispersão |
| pKa | Logaritmo de base 10 negativa da constante de dissociação de um ácido |
| PLA | Poli (ácido láctico) |
| PLGA | Poli (ácido láctico co-ácido glicólico) |
| PSA | Antígeno prostático específico |
| PV | Própolis verde |
| PV | Própolis verde |
| PVB | Própolis vermelha brasileira |
| PVB | Própolis vermelha brasileira |
| R ² | Coefficiente de correlação linear |
| rpm | Rotações por minuto |
| SIR | <i>Selected Ion Recording</i> |
| SISGEN | Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado |
| SQ | <i>Single Quadrupole</i> |
| TNF | Fator de necrose tumoral |

| | |
|---------|---|
| t_r | Tempo de retenção |
| UPLC-MS | Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - Espectrômetro de Massas |
| UV-Vis | Ultravioleta-Visível |
| v/v | Quantidade de volume (mL) em 100 mL de solvente |
| vs | <i>Versus</i> |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----|-------------------|
| ° | Grau |
| ® | Marca registrada |
| TM | <i>Trade Mark</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| RESUMO | i |
| ABSTRACT | ii |
| LISTA DE TABELAS | vii |
| LISTA DE SÍMBOLOS | xii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 1 |
| 2.1 CÂNCER DE PRÓSTATA | 3 |
| 2.1.1 Próstata | 3 |
| 2.1.2 Desenvolvimento do câncer de próstata | 4 |
| 2.1.3 Diagnóstico e Tratamento convencional | 4 |
| 2.2 PRÓPOLIS..... | 6 |
| 2.2.1 Própolis verde | 6 |
| 2.2.2 Própolis vermelha Brasileira | 7 |
| 2.3 NANOTECNOLOGIA E NANOMEDICINA | 9 |
| 2.3.1 Nanopartículas poliméricas | 10 |
| 2.3.2 Mecanismos de estabilização de nanopartículas | 13 |
| 3 OBJETIVOS | 14 |
| 3.1 GERAL | 14 |
| 3.2 ESPECÍFICOS | 14 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 15 |
| 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE PV E PVB | 15 |
| 4.1.1 Teor de flavonoides totais nos extratos de própolis | 15 |
| 4.1.2 Teor de fenólicos totais nos extratos de própolis | 16 |
| 4.1.3 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de própolis | 17 |
| 4.2 DESENVOLVIMENTO DA SUSPENSÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS | 17 |
| 4.2.1 Método de preparo das nanopartículas | 17 |
| 4.2.2 Seleção do componente oleoso | 17 |
| 4.2.3 Seleção do componente estabilizante | 18 |
| 4.2.4 Otimização do processo por <i>Box Behnken Design</i> (BBD) | 18 |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS | 18 |
| 4.3.1 Diâmetro hidrodinâmico, PdI e potencial zeta | 19 |
| 4.3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)..... | 19 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3.3 | Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) | 20 |
| 4.3.4 | Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) | 20 |
| 4.4 | DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA PV | 20 |
| 4.4.1 | Desenvolvimento do método de análise | 21 |
| 4.4.2 | Validação | 22 |
| 4.5 | METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA PVB | 25 |
| 4.6 | AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DE PV E PVB E DAS EFICIÊNCIAS DE ENCAPSULAMENTO | 26 |
| 4.7 | ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES | 26 |
| 4.8 | PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO | 26 |
| 4.8.1 | Determinação da condição <i>sink</i> e seletividade dos métodos | 26 |
| 4.8.2 | Perfil de liberação de artepelin C e formononetina | 27 |
| 4.9 | AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS LIVRES E ENCAPSULADOS | 29 |
| 4.9.1 | Linhagens celulares e condução dos ensaios | 29 |
| 4.9.2 | Viabilidade celular por ensaio de captura do corante vermelho neutro | 30 |
| 4.9.3 | Viabilidade celular por quantificação de ácidos nucleicos | 30 |
| 4.9.4 | Análise estatística | 31 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 5.1 | CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE PV E PVB | 32 |
| 5.1.1 | Teor de flavonoides totais | 32 |
| 5.1.2 | Teor de fenólicos totais | 36 |
| 5.1.3 | Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de própolis | 37 |
| 5.2 | DESENVOLVIMENTO DA SUSPENSÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS | 38 |
| 5.2.1 | Seleção do componente oleoso | 38 |
| 5.2.2 | Seleção do componente estabilizante | 39 |
| 5.2.3 | Otimização do processo por <i>Box Behnken Design</i> (BBD) | 41 |
| 5.3 | CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS | 45 |
| 5.3.1 | Diâmetro hidrodinâmico, PdI e potencial zeta | 45 |
| 5.3.2 | Calorimetria diferencial de varredura (DSC) | 46 |
| 5.3.3 | Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) | 48 |
| 5.3.4 | Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) | 49 |
| 5.4 | DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA PV | 50 |

| | |
|---|----|
| 5.4.1 Composição e vazão da fase móvel | 50 |
| 5.4.2 Validação..... | 53 |
| 5.4.3 Avaliação do extrato de PV e da eficiência de encapsulamento..... | 62 |
| 5.5 MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA PVB POR UPLC-MS | 63 |
| 5.5.1 Seletividade do método | 63 |
| 5.5.2 Avaliação do extrato de PVB e Eficiência de encapsulamento | 65 |
| 5.6 ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES | 65 |
| 5.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> | 68 |
| 5.7.1 Determinação da condição <i>sink</i> e seletividade dos métodos..... | 68 |
| 5.7.2 Perfil de liberação de artepelin C e formononetina | 70 |
| 5.8 AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS LIVRES E ENCAPSULADOS | 73 |
| 5.8.1 Linhagens celulares | 73 |
| 5.8.2 Citotoxicidade <i>in vitro</i> dos extratos livres e encapsulados em células PC-3 e 3T3 | 74 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 86 |
| REFERÊNCIAS | 87 |

1 INTRODUÇÃO

Com um estilo de vida cada vez mais urbano e sedentário, as pessoas estão mais susceptíveis a fazerem parte dos altos índices de morbidade e mortalidade decorrentes dos mais variados tipos de câncer. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2018 ocorreram 18 milhões de casos novos dos mais diversos tipos da doença e 9,8 milhões de pessoas foram à óbito em decorrência de câncer, sendo a incidência em homens superior em comparação às mulheres (BRASIL, 2019).

De acordo com as estimativas do INCA, são esperados 625 mil novos casos de câncer no Brasil entre os anos de 2020 e 2022 (BRASIL, 2019). A *American Cancer Society* presume que mais de 608 mil pessoas morrerão de câncer somente nos Estados Unidos, sendo o câncer de próstata um dos principais tipos listados (SIEGEL et al., 2021).

O interesse por terapias contra o câncer que sejam mais seguras, com menos efeitos colaterais, direcionamento ao sítio alvo e que evitem mecanismos de resistência tumoral tem crescido nos últimos anos, abrindo espaço para pesquisas focadas em nanomedicina e em compostos alternativos às terapias convencionais (AHMAD et al., 2019; GUAN et al., 2021).

Por apresentarem atividades biológicas diversificadas, as própolis brasileiras tem ganhado destaque no mercado internacional, sendo exportadas para o Japão, Estados Unidos e países da Europa. O interesse no potencial da própolis é tamanho que levou à formação de um grupo para trabalhar em uma nova ISO (ISO/TC34/SC19/WG2) que estabeleça uma padronização dos processos que envolvem esse tipo de material.

Estudos recentes tem mostrado o potencial de extratos de própolis contra tumores como os de cabeça e pescoço, mama, fígado, pele, bexiga, entre outros (PATEL, 2016; BERRETTA et al., 2020), porém muitos dos seus compostos de interesse apresentam baixa biodisponibilidade, gerando uma demanda para a sua veiculação em sistemas nanoparticulados (ALJUFFALI et al., 2016; WATKINS et al., 2015).

Este projeto surgiu pela ideia de realizar um estudo comparativo da atividade das duas principais própolis brasileiras veiculadas em nanocarreadores do tipo poliméricos contra tumores de próstata, visto não ter sido encontrado na literatura científica trabalho semelhante. Além disso, o encapsulamento de própolis em sistemas nanoestruturados com aplicação antitumoral, apesar de promissor, ainda é pouco explorado. Para tanto, nós desenvolvemos nanocápsulas carregadas com extratos de própolis verde (PV) ou própolis vermelha brasileira (PVB) que foram caracterizadas por diferentes técnicas e comparadas com os extratos em forma

livre quanto à sua citotoxicidade em células metastáticas oriundas de câncer primário de próstata.

O presente trabalho está inserido no projeto temático financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (nº 2017/04138-8), coordenado pelo Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, com a colaboração da Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari, e no projeto de pesquisa regular financiado pela FAPESP (nº 2018/13465-5) coordenado pela Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari. Além disso, essa pesquisa faz parte do INCT-NANOFARMA (FAPESP nº 2014/50928-2, CNP1 465687/2014-8) e está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) (AF234D8).

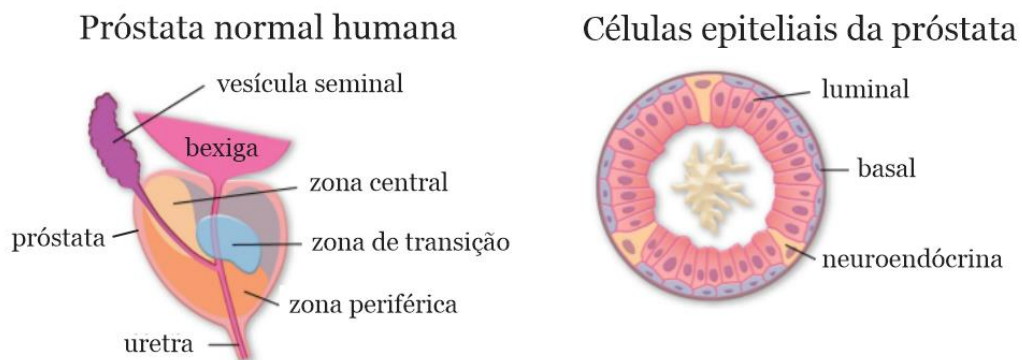
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE PRÓSTATA

2.1.1 Próstata

A próstata é uma glândula situada abaixo da bexiga formada por tecidos glandulares em forma de ácinos que se dividem entre zonas central, de transição e periférico, envolvendo as regiões dos ductos ejaculatórios e uretra, e um tecido fibromuscular que envolve essa região, o estroma (AARON; FRANCO; HAYWARD, 2016; HENRY et al., 2019). O epitélio prostático é formado por três tipos de células, basal, luminal e neuroendócrinas, sendo que as duas primeiras e as células do estroma expressam receptores andrógenos, essenciais ao desenvolvimento da próstata (HEINLEIN; CHANG, 2004; HENRY et al., 2019; WANG et al., 2018). A Figura 1 ilustra as principais regiões de um tecido prostático humano normal.

Figura 1 - Estruturas da próstata humana normal



Fonte: Adaptado de WANG et al., 2018.

Inicialmente, os receptores andrógenos são ativados pela ligação dos seus substratos, testosterona ou di-hidrotestosterona, gerando mudanças em sua estrutura com consequente translocação nuclear. No núcleo, esses receptores tem a capacidade de atuar como fatores de transcrição, ativando genes responsáveis por induzir proliferação celular e apoptose (HEINLEIN; CHANG, 2004).

Um dos principais produtos das células do epitélio prostático, o antígeno prostático específico (PSA) ou calicreína-3 é uma glicoproteína do tipo serina protease cuja função principal é promover a hidrólise de proteínas como as semenogelina I e II que coagulam o sêmen, liquefazendo-o e permitindo que os espermatozoides se movimentem (PEZARO; WOO;

DAVIS, 2014; FERRO et al., 2016; PÉREZ-IBAVE; BURCIAGA-FLORES; ELIZONDO-RIOJAS, 2018).

2.1.2 Desenvolvimento do câncer de próstata

O câncer de próstata é o segundo tipo de câncer mais incidente em homens no mundo e o sexto com maiores índices de mortalidade nesse gênero (RAWLA, 2019; KHAN et al., 2020). No Brasil, é o primeiro mais diagnosticado após o câncer de pele não melanoma e o segundo tipo mais letal em homens, sendo estimado mais de 65 mil casos para cada ano entre 2020 e 2022 (JEREZ-ROIG et al., 2014; BRASIL, 2019).

Esse tipo de câncer é prevalente em homens afro-americanos e com mais de 65 anos, sendo os principais fatores de risco a idade avançada e histórico familiar da doença, além de condições ambientais como obesidade, hábito de fumar e sedentarismo (RAWLA, 2019; CHOWDHURY-PAULINO et al., 2021).

Quando as células do lúmen prostático sofrem uma mutação neoplásica mas as células basais ainda mantêm sua estrutura normal, considera-se que existe uma lesão pré-cancerosa, denominada neoplasia intraepitelial prostática de alto grau. Se, porém, as células da camada basal também estiverem comprometidas, o paciente é diagnosticado com adenocarcinoma da próstata, de modo que a maior parte dos casos desse tipo de câncer ocorrem na zona periférica da glândula (HENRY et al., 2019; LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011).

Uma das características que diferenciam o câncer de próstata de outros tipos de cânceres é o fato de que em cerca de 80% dos casos existem mais de dois núcleos tumorais de origem celular e em sítios diferentes, que podem evoluir de maneira independente (YEOMAN, 2017). A partir de um câncer localizado, as células neoplásicas podem ultrapassar a camada basal e migrar para tecidos próximos, especialmente os linfonodos locais, podendo alcançar a circulação sanguínea e se espalharem para outros sítios metastáticos, sendo um dos mais comuns os tecidos ósseos (WANG et al., 2018).

2.1.3 Diagnóstico e Tratamento convencional

Os critérios e metodologias para diagnóstico do câncer de próstata ainda são controversos entre a comunidade mundial de urologistas, porém a suspeita geralmente é originada a partir de níveis elevados de PSA e anormalidades detectadas pelo exame retal digital. A confirmação da existência do câncer é feita por exame de ultrassonografia transretal

e biópsia do tecido da glândula (STABILE et al., 2020). O prognóstico sugerido pela biópsia baseia-se em um sistema de cinco grupos (*Grade Group*), que são divididos de acordo com pontuações de 2 a 10 (*Gleason Score*) de acordo com os dois padrões predominantes de células, variando de morfologia celular normal a presença de mutação (CIMADAMORE et al., 2021).

O início do rastreamento é recomendado a partir dos 45 anos de idade, especialmente para homens com histórico familiar da doença (RAWLA, 2019), mas deve sempre ser discutido entre médico e paciente. Os níveis séricos de PSA podem estar elevados em casos de hiperplasia prostática benigna ou simplesmente por manipulação da próstata, não devendo, portanto, ser um parâmetro decisivo para o diagnóstico de forma isolada (LOEB; GASHTI; CATALONA, 2009).

Em relação ao tratamento, dependendo das condições do paciente, da sua expectativa de vida e do estágio da doença, opta-se por exames de monitoramento do avanço do tumor ou pelas opções de tratamentos disponíveis, que envolvem principalmente quimioterapia, radioterapia, braquiterapia, hormonioterapia e/ou prostatectomia radical, que consiste na remoção da próstata e vesículas seminais (IZIDORO et al., 2019). A prostatectomia radical, considerada como padrão-ouro no tratamento desse câncer, pode levar o paciente a desenvolver problemas como disfunção erétil e incontinência urinária (NOSSITER et al., 2021).

O tratamento farmacológico pode incluir quimioterápicos como docetaxel e cabazitaxel, que atuam como bloqueadores de mitose; bloqueadores de receptor andrógeno ou de produção de testosterona, como abiraterone e enzalutamide; imunoterápicos, como a vacina Sipuleucel-T (Provenge); ou ainda radioisótopos (KOMURA et al., 2018). Além dos inúmeros efeitos colaterais e prejuízos à qualidade de vida que os tratamentos convencionais ocasionam, muitos tumores prostáticos primários ou metastáticos podem desenvolver mecanismos de resistência aos agentes farmacológicos comumente utilizados (PATEL, 2016; IZIDORO et al., 2019).

Casos de terapia hormônio refratária geralmente ocorrem devido ao aumento da expressão de receptores andrógenos ou ainda por mutações nessas proteínas (HU; WANG; SUN, 2017). Essas alterações podem tornar os receptores independentes, não havendo mais a necessidade da ligação dos hormônios para o ativarem, atuando então como fatores de transcrição na expressão de genes importantes ao desenvolvimento do tumor (HEINLEIN; CHANG, 2004).

A demanda por estratégias terapêuticas opcionais aos tratamentos existentes contra o câncer despertou o interesse por materiais como a própolis, que tem sido objeto de estudo por demonstrar atividade citotóxica contra vários tipos de tumores, incluindo os de próstata,

representando uma notável estratégia de potencialização de quimioterápicos convencionais e redução dos seus efeitos colaterais (PATEL, 2016; ZABAIYOU et al., 2017a).

2.2 PRÓPOLIS

A própolis é um composto resinoso produzido por abelhas principalmente da espécie *Apis mellifera* formado por substâncias coletadas de diferentes partes de plantas misturadas à saliva e cera das abelhas e pólen (SILVA et al., 2012; PREMRATANACHAI; CHANCHAO, 2014; SFORCIN, 2016). É mundialmente conhecida por suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral e antimicrobiana (SFORCIN; BANKOVA, 2011; DANTAS SILVA et al., 2017).

A composição da própolis pode variar de acordo com a região, clima e sazonalidade, sendo que mais de 300 diferentes compostos já foram identificados. Em geral, ela apresenta 50% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de compostos orgânicos e 5% de pólen (SILVA et al., 2012; SFORCIN, 2016). São descritos 13 grupos nas diferentes regiões do Brasil, 12 deles apresentando cores que variam entre o amarelo, marrom e verde, sendo o grupo mais recentemente caracterizado de cor vermelha (DANTAS SILVA et al., 2017; REIS et al., 2019).

Em face da complexa composição química desse material, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) elaborou uma Instrução Normativa publicada em 2001 estabelecendo os requisitos mínimos de qualidade para diversos produtos apícolas, dentre eles a própolis e seus extratos (BRASIL, 2001).

2.2.1 Própolis verde

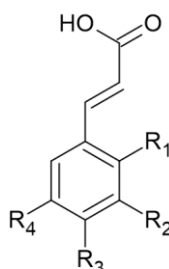
Proveniente da região Sudeste do Brasil, a principal fonte botânica da PV (Figura 2) é o arbusto *Baccharis dracunculifolia*, conhecida como “vassourinha do campo”(BERRETTA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2020). Os principais componentes dessa própolis são compostos fenólicos com destaque para os ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (Figura 3) como o artepelin C, bacarina, drupanina, e ácidos cumárico e cafeico, abundantes na PV brasileira (SALGUEIRO; CASTRO, 2016; BERRETTA et al., 2017; ZABAIYOU et al., 2017; ENDO et al., 2018).

Figura 2 - Própolis verde



Fonte: FRANÇA; RAMOS JÚNIOR, 2019.

Figura 3 - Estrutura básica dos ácidos hidroxicinâmicos



Fonte: VALANCIENE et al., 2020.

Szliszka e colaboradores observaram em estudos realizado em células da linhagem LNCaP (metástase linfonodal de câncer de próstata) que o extrato etanólico de PV de origem brasileira e o artepelin C de forma isolada são capazes de induzir a apoptose mediada pelo ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL), sensibilizando as células resistentes à esse mecanismo de morte celular programada (SZLISZKA et al., 2011; SZLISZKA et al., 2012). Estudos recentes demonstraram que a bacarina é capaz de inibir seletivamente a enzima AKR1C3, uma alfa-ceto redutase super-expressa em tumores prostáticos hormônio dependentes (ENDO et al., 2012; RODRIGUES et al., 2021).

2.2.2 Própolis vermelha Brasileira

Inicialmente descrita na literatura em 2007, a PVB (Figura 4), ganhou destaque no mercado mundial por apresentar uma composição diferenciada das demais própolis (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016). Sua principal fonte botânica é uma espécie encontrada em mangues e no litoral da região Nordeste do país, a *Dalbergia ecasthophyllum* (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016; REIS et al., 2019). A existência de derivados poliprenilados de

benzofenonas em extratos dessa própolis indicam a coparticipação de uma outra fonte vegetal, a *Symphonia globulifera* (ALDANA-MEJIA et al., 2021).

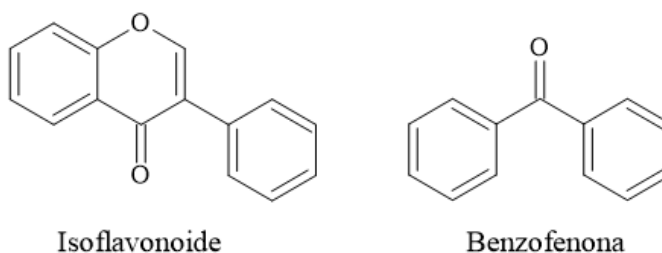
Figura 4 - Própolis vermelha brasileira



Fonte: BERLINCK, 2020.

Os compostos mais relacionados à sua atividade biológica são metabólitos secundários do tipo isoflavonoides, como a formononetina, biochanina A, vestitol, neovestitol, liquiritigenina, isoliquiritigenina e pinocembrina, sendo também encontrados benzofenonas e outras classes de compostos (FREIRES; DE ALENCAR; ROSALEN, 2016; BERRETTA et al., 2017; REIS et al., 2019). As estruturas químicas dos isoflavonoides e benzofenonas estão ilustradas na Figura 5.

Figura 5 – Estruturas químicas básicas dos isoflavonoides e benzofenonas



Fonte: Adaptado de CHERRAK et al., 2016; HASSAN; OLAOYE, 2020.

Dados da literatura apontaram que a formononetina é capaz de induzir apoptose em células das linhagens LNCaP (YE et al., 2012) e PC-3 (metástase óssea de câncer de próstata), sugerindo como mecanismo principal a inibição da sinalização celular mediada pelo fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), que pode estar relacionado à gênese do tumor (HUANG et al., 2014). Szliszka et al. apontaram que a biochanina A também é capaz de induzir apoptose mediada por TRAIL em células de câncer de próstata LNCaP e DU145 (SZLISZKA et al., 2013).

Botteon et al. demonstraram a capacidade citotóxica dose-dependente do extrato de PVB e diferentes frações em células da linhagem PC-3, correlacionando essa atividade com a presença de altas concentrações de formononetina, liquiritigenina, medicarpina e benzofenonas nas diferentes amostras testadas (BOTTEON et al., 2021).

A partir dessas observações, considera-se que os extratos de PV e PVB sejam possíveis alternativas para serem utilizadas na terapêutica do câncer de próstata. Entretanto, esses extratos apresentam limitações como a baixa estabilidade inerente de alguns dos seus compostos bioativos, sendo estes susceptíveis à reações de degradação que reduzem a sua eficácia (DAUDT et al., 2013; WATKINS et al., 2015), alta lipossolubilidade de seus bioativos a ponto de não se solubilizarem no sangue ou ainda terem compostos tão hidrofílicos ou grandes a ponto de não conseguirem atravessar as membranas biológicas, resultando na sua baixa biodisponibilidade (ENRICO, 2019; WATKINS et al., 2015). Uma das estratégias para superar essas limitações é o encapsulamento dos mesmos em nanopartículas.

2.3 NANOTECNOLOGIA E NANOMEDICINA

Historicamente, o conceito de nanotecnologia foi apresentado ao mundo pelo físico Richard Feynman em uma palestra intitulada “*There is plenty of room at the bottom*”, em 1959. Anos após, em 1974, o cientista Norio Taniguchi instituiu o conceito de “nanotecnologia” (BAYDA et al., 2020). O *Food and Drug Administration* (FDA) considera como “nanomaterial” um produto composto por materiais com pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica (de 1 a 100 nm) ou material com diâmetro de até 1000 nm que apresente alteração de propriedades físicas, químicas ou biológicas que podem ser atribuídas ao seu tamanho (FDA, 2014).

No campo da nanomedicina, já há no mercado medicamentos nanotecnológicos de primeira geração contra o câncer, como Doxil® (cloridrato de doxorubicina) e Abraxane® (paclitaxel). Esses medicamentos apresentam como vantagem serem direcionados a região tumoral de forma passiva pelo efeito de Permeação e Retenção Aumentados (EPR) devido ao reduzido diâmetro das nanopartículas (BARAR; OMIDI; GUMBLETON, 2015). O efeito EPR é baseado na teoria de que partículas com diâmetro entre 50 e 250 nm teriam maior facilidade de entrar no microambiente tumoral devido à presença de fenestrações nos capilares sanguíneos de regiões tumorais, ficando ali retidas devido ao baixo fluxo linfático causado pelo processo inflamatório envolvido no câncer (WICKI et al., 2015; BARAR; OMIDI; GUMBLETON, 2015; NEL; RUOSLAHTI; MENG, 2017).

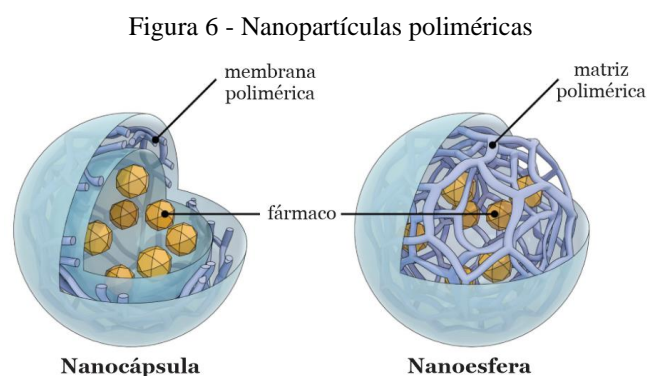
Além disso, o encapsulamento de substâncias ativas em sistemas nanoparticulados pode aumentar a estabilidade e solubilidade desses compostos, reduzir seus efeitos colaterais, promover uma liberação controlada ou sustentada dos mesmos ou ainda um direcionamento ao alvo biológico por tamanho e/ou características de superfície diferenciadas, o que propicia uma internalização celular aumentada e mecanismos de resistência tumoral reduzidos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; WATKINS et al., 2015; EDIRIWICKREMA; SALTZMAN, 2015; WICKI et al., 2015).

O maior desafio no desenvolvimento de um nanocarreador para o tratamento do câncer está em correlacionar o ativo, a via de administração, as particularidades do tumor e a formulação e ainda apresentar as características adequadas de biodistribuição, eliminação do organismo e toxicidade (VAN DER MEEL et al., 2019). Características como o tamanho, geometria, carga superficial e composição química influenciam tanto no desempenho como na estabilidade das nanopartículas (BANIK; FATTAHI; BROWN, 2016).

Dentre os tipos de nanopartículas mais apropriados ao encapsulamento de produtos de origem natural estão os lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, dendrímeros e as nanopartículas poliméricas, cada uma apresentando particularidades que podem ser mais vantajosas ou não para o fármaco e a via de administração escolhidos (ENRICO, 2019).

2.3.1 Nanopartículas poliméricas

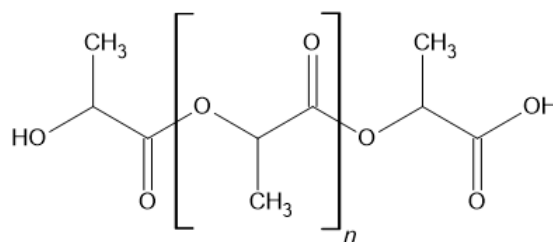
As nanopartículas poliméricas podem ser do tipo nanoesferas, formadas por uma matriz polimérica, ou nanocápsulas, com um núcleo oleoso envolto por uma membrana polimérica, podendo o fármaco estar disperso na matriz, dissolvido no centro ou ainda adsorvido à superfície das nanopartículas (AHLAWAT; HENRIQUEZ; NARAYAN, 2018), conforme ilustra a Figura 6.



As nanopartículas do tipo poliméricas podem ser produzidas com polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, sintéticos ou naturais, permitindo inclusive a funcionalização da sua superfície para um direcionamento ativo ao sítio de ação, ou passivo por meio do seu acúmulo no tecido tumoral através do efeito EPR (WANG et al., 2016; MASOOD, 2016). Geralmente, esse tipo de nanopartícula proporciona alta estabilidade e eficiência de encapsulação de ativos (LU et al., 2011).

O polímero poli ácido lático (PLA) (Figura 7) é um poliéster obtido a partir de produtos como o milho e a cana de açúcar, aprovado pelo FDA para uso endovenoso por ser biodegradável e biocompatível uma vez que a sua hidrólise resulta em monômeros de ácido lático não tóxicos e facilmente metabolizados pelo organismo humano (ARMENTANO et al., 2017; EDIRIWICKREMA; SALTZMAN, 2015; QI et al., 2019; ZAABA; JAAFAR, 2020). O PLA está disponível no mercado na forma de PLLA, PDLA ou PDLLA, formado por monômeros de L ou D-ácido lático ou uma mistura de ambos, respectivamente, (LAKKIREDDY; BAZILE, 2016; ZAABA; JAAFAR, 2020) que influenciam na sua cristalinidade assim como no perfil de liberação das substâncias ativas encapsuladas em nanopartículas preparadas com esse polímero (CASALINI et al., 2019).

Figura 7- Estrutura química do poli (ácido lático) – PLA



Fonte: VARGAS-VILLAGRAN et al., 2011.

Existem vários métodos de preparo de nanopartículas do tipo poliméricas. As mais comuns envolvem técnicas como emulsificação e evaporação de solvente, *salting-out*, nanoprecipitação e polimerização de monômeros (WANG et al., 2016).

O método de nanoprecipitação, inicialmente descrito por Fessi e colaboradores (FESSI et al., 1989) permite a obtenção de nanopartículas poliméricas do tipo nanoesferas (precipitação de polímero pré-formado) ou nanocápsulas (deposição interfacial de polímero), sendo vantajoso por ser de baixa complexidade e rápida execução, escalonável, consumir pouca energia e proporcionar uma boa eficiência de encapsulamento de fármacos lipofílicos, além de

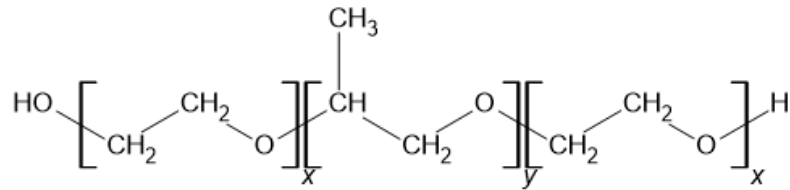
geralmente propiciar a formação de populações monodispersas de nanoestruturas (FESSI et al., 1989; YADAV; SAWANT, 2010; SALATIN et al., 2017). Para a obtenção de estruturas do tipo nanocápsulas, deve-se solubilizar o polímero, óleo e o fármaco em um solvente orgânico miscível em água e adicionar esse sistema à uma fase aquosa contendo um agente estabilizante, sob agitação. Neste processo, o solvente orgânico irá se difundir para a fase aquosa levando a precipitação/deposição do polímero na interface da gota de óleo formada, culminando com a formação das nanoestruturas (FESSI et al., 1989; (ALSHAMSAN, 2014; SALATIN et al., 2017).

Polímeros dos mais variados tipos podem ser utilizados para a formação de nanocápsulas com a função de proteger o fármaco contido no núcleo oleoso, sendo preferidos os polímeros e copolímeros biodegradáveis e, portanto, biocompatíveis, que permitam a liberação do ativo em um ambiente mais favorável à sua ação e sejam facilmente removidos do organismo, como, por exemplo, os poliésteres PLA, poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), ou ainda polímeros de origem natural, como alginato e quitosana, sendo escolhidos de acordo com os objetivos pretendidos (BENNET; KIM, 2014; DENG et al., 2020). Além do polímero, o tensoativo e, no caso da nanocápsula, o óleo, são componentes críticos da formulação a serem cuidadosamente definidos. A seleção destes componentes deve ser realizada de acordo com os objetivos pretendidos e com a interação dos mesmos com o fármaco que será encapsulado.

O reduzido diâmetro e a alta área superficial das nanopartículas as torna instáveis por natureza, sendo recomendado, portanto, o uso de tensoativos para reduzir a tensão superficial dessas estruturas e proporcionar estabilidade cinética ao sistema, evitando a formação de aglomerados (PEREIRA et al., 2013; ALLOTEY-BABINGTON et al., 2018; SULTANA et al., 2020).

Os poloxâmeros são copolímeros tribloco, não iônicos e biodegradáveis, formados por uma porção central hidrofóbica de óxido de polipropileno rodeado por dois blocos hidrofílicos de óxido de polietileno, conforme ilustra a Figura 8. São utilizado como agentes estabilizadores de nanopartículas e aprovados pelo FDA para uso em formulações injetáveis (FAKHARI; CORCORAN; SCHWARZ, 2017; ALLOTEY-BABINGTON et al., 2018). Esse tipo de estabilizante confere às nanoestruturas estabilidade estérica e evita o processo de opsonização aumentando a meia-vida das partículas no organismo. Além disso, apresenta um potencial inibitório de efluxo promovido pela glicoproteína P através da depleção seletiva de ATP em células tumorais resistente à fármacos que superexpressam essa proteína (ALAKHOVA et al., 2010; MOURA et al., 2020).

Figura 8 – Estrutura química de um poloxâmero



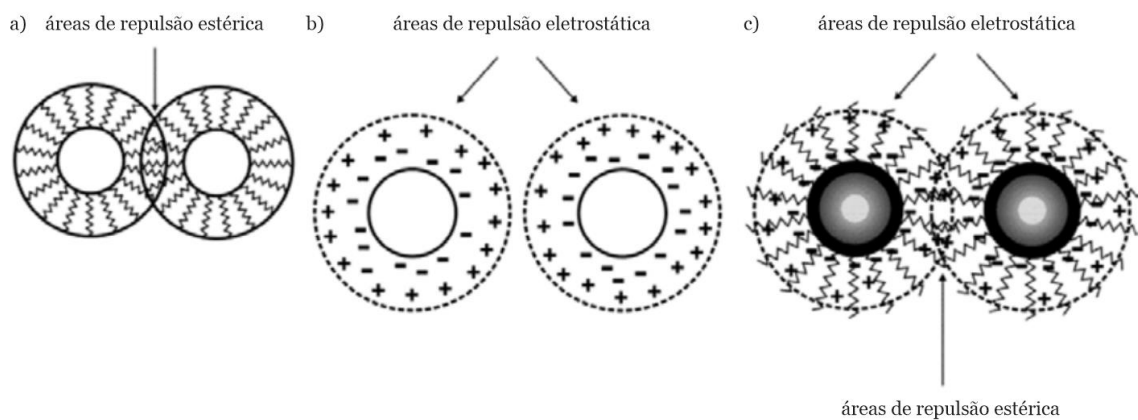
Fonte: BRUSCHI et al., 2017.

2.3.2 Mecanismos de estabilização de nanopartículas

A estabilidade de um sistema nanoestruturado depende da intensidade das forças de atração ou repulsão entre as nanopartículas e da composição da sua superfície, podendo ser de três tipos (CAPEK, 2013; SULTANA et al., 2020), conforme ilustrado na Figura 9:

- estérica: a presença de polímeros anfifílicos na superfície das nanopartículas promove a formação de uma barreira física, evitando que as partículas fiquem próximas, devido às cadeias hidrofílicas que se posicionam voltadas à água do meio onde elas estão inseridas;
- elétrica: as partículas podem apresentar cargas superficiais positivas ou negativas, sendo que partículas com carga semelhantes se repelem evitando a sua aglomeração;
- eletroestérica: quando ambos os mecanismos estão presentes na nanoestrutura.

Figura 9 - Mecanismos de estabilidade de nanoestruturas em solução



Onde: a) estabilidade estérica; b) estabilidade elétrica; c) estabilidade eletroestérica.

Fonte: Adaptado de CAPEK, 2013.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo extrato de PV ou PVB e avaliação da sua atividade biológica em células de câncer de próstata.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais nos extratos de própolis;
- b) avaliação da atividade antioxidante dos extratos;
- c) desenvolvimento e otimização do processo de obtenção de suspensões de nanopartículas poliméricas contendo extrato de PV ou PVB;
- d) caracterização das nanocápsulas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Eletroforético (ELS), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- e) determinação da concentração de nanopartículas em suspensão por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA);
- f) desenvolvimento e validação de metodologia cromatográfica para quantificação dos principais marcadores de PV;
- g) determinação da eficiência de encapsulamento de compostos majoritários das própolis na formulação desenvolvida;
- h) avaliação do perfil de liberação *in vitro* de artepelin C e formononetina das nanopartículas carregadas com os extratos de própolis;
- i) avaliação da atividade citotóxica dos extratos livres e encapsulados em células de câncer de próstata da linhagem PC-3 e em células normais do tipo 3T3;
- j) avaliação da estabilidade das dispersões ao longo do tempo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE PV E PVB

Os extratos hidroalcoólicos de PV e PVB foram gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP). Os extratos de PV e PVB utilizados são provenientes de própolis coletadas em fevereiro de 2019 na região de Formiga (Minas Gerais) e abril de 2018 em Canavieiras (Bahia), respectivamente.

Com o intuito de melhor entender o potencial citotóxico *in vitro* dos extratos de PV e PVB em células de câncer de próstata, foi realizada a caracterização desses extratos, permitindo assim uma posterior correlação entre os resultados.

4.1.1 Teor de flavonoides totais nos extratos de própolis

4.1.1.1 Padronização do método e curvas de calibração

A determinação do teor de flavonoides totais nos extratos de própolis foi baseada nos procedimentos descritos por Woisky e Salatino (WOISKY; SALATINO, 1998) e Funari e Ferro (FUNARI; FERRO, 2006a). Na literatura existem variações da aplicação dessa metodologia com relação ao tipo de solvente utilizado, o tempo de reação e o comprimento de onda de análise. Sendo assim, foi realizada uma padronização do processo com a adaptação dos procedimentos utilizados pelos autores supracitados.

De modo a avaliar uma possível influência negativa do solvente na reação entre a substância padrão (quercetina) e o íon alumínio (Al^{3+}), foram preparadas soluções utilizando como solventes etanol ou metanol da seguinte forma: somente com quercetina, na concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$; e com quercetina a 5 $\mu\text{g/mL}$ e solução de cloreto de alumínio a 0,1% m/v para que ocorresse a formação do complexo quercetina-alumínio. As análises foram realizadas em espectrofotômetro Ultravioleta-Visível (UV-Vis) em 425 nm (NanoPhotometer UV-Vis, Implén).

Para a investigação do comprimento de onda mais apropriado às análises, foram preparadas soluções etanólicas de quercetina a 4 $\mu\text{g/mL}$ com 0,1% m/v de cloreto de alumínio em triplicata. Foram realizadas varreduras das amostras em espectrofotômetro (T70 UV-Vis Spectrophotometer, PG Instruments) na faixa de 200 a 600 nm após 5, 15 e 30 minutos de

reação, sendo avaliadas a média e a moda dos comprimentos de onda obtidos na região de interesse.

Em seguida, foi realizada a avaliação do tempo de reação. A partir de uma solução mãe de quercetina a 50 $\mu\text{g/mL}$ em etanol foram construídas curvas de calibração na faixa de concentração de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$ com adição de quantidade suficiente (q.s.) de solução etanólica de cloreto de alumínio a 2,5% (m/v) com concentração final na solução de 0,1% (m/v). As amostras foram avaliadas no comprimento de onda padronizado (440 nm) em diferentes tempos (5, 10 e 15 min.). Foi realizada a análise estatística por variância (ANOVA) com pós teste de Tukey pelo *software GraphPad Prism*^{®5} para verificar se houve diferença significativa entre os tempos de reação.

Definidas as variáveis da metodologia (solvente, comprimento de onda e tempo de reação), foram construídas curvas de calibração de quercetina com 0,1% (m/v) de cloreto de alumínio, em triplicata, nas concentrações de 1 a 8 $\mu\text{g/mL}$ conforme descrito anteriormente.

4.1.1.2 Avaliação do teor de flavonoides totais nas amostras de extrato

As amostras foram preparadas em triplicata a partir de soluções mãe a 2 mg/mL dos extratos de PV e PVB em etanol na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ com adição de solução etanólica de cloreto de alumínio a 2,5% (m/v), conforme descrito no item anterior. Decorridos 15 minutos de reação, tiveram suas absorbâncias determinadas por espectrofotometria em 440 nm (T70 UV-Vis Spectrophotometer, PG Instruments).

4.1.2 Teor de fenólicos totais nos extratos de própolis

A quantidade de compostos fenólicos totais nos extratos de PV e PVB foi avaliada de acordo com metodologia também descrita por Funari e Ferro (FUNARI; FERRO, 2006). Foram construídas curvas de calibração, em triplicata, utilizando como padrão o ácido gálico em concentrações de 1 a 10 $\mu\text{g/mL}$, água como solvente e q.s. de reagente de Folin Denis e de solução saturada de carbonato de sódio a 20% (m/v).

Como amostras, foram utilizadas soluções metanólicas dos extratos de PV e PVB a 2 mg/mL diluídas a 40 $\mu\text{g/mL}$ sob as mesmas condições das soluções contendo o padrão. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos, sendo posteriormente determinadas as suas absorbâncias em 760 nm por espectrofotometria (T70 UV-Vis Spectrophotometer, PG Instruments).

4.1.3 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de própolis

Os extratos de PV e PVB tiveram sua atividade antioxidante avaliada pelo método de redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) desenvolvido por Mello (MELLO, 2022), com modificações. Em microplacas de 96 poços, foram adicionadas alíquotas de soluções metanólicas de PV ou PVB para a obtenção de concentrações de 1 a 60 µg/mL, 50 µL de solução metanólica de DPPH 333 µM e 50 µL de tampão citrato (pH 4,5). Como padrão antioxidante foi utilizado ácido ascórbico nas concentrações de 1 a 20 µg/mL. As placas foram mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos, sendo as absorvâncias obtidas em 517 nm em leitor de microplacas (SPECTRAMax, Molecular Devices).

A redução do radical DPPH foi calculada com base na porcentagem de atividade antioxidante (Aa%), conforme Equação 1, e o potencial antioxidante expresso na concentração em que o extrato produz metade da sua resposta máxima (EC₅₀), sendo este calculado por meio do *software* GraphPad Prism[®]5.

$$Aa\% = [(Absorbância\ controle - Absorbância\ amostra) / Absorbância\ controle] \times 100 \quad (1)$$

Onde: Aa%: porcentagem de atividade antioxidante.

4.2 DESENVOLVIMENTO DA SUSPENSÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

4.2.1 Método de preparo das nanopartículas

As nanocápsulas foram obtidas pelo método de deposição interfacial de polímero. Uma fase orgânica constituída pelo polímero PLA (Purasorb PDL 02, Corbion), óleo e acetona foi vertida em uma fase aquosa contendo um estabilizante. O sistema foi mantido sob agitação magnética por cerca de 24 horas para garantir a total evaporação do solvente orgânico utilizado, obtendo-se, assim, a suspensão de nanocápsulas sem fármaco (NC-B). Para o preparo das nanocápsulas carregadas com PV (NC-PV) ou PVB (NC-PVB), os extratos, previamente solubilizados em etanol, foram adicionados à fase orgânica, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente.

4.2.2 Seleção do componente oleoso

Três óleos foram propostos para a formulação por serem aprovados pelo FDA para uso intravenoso: triglicérides do ácido cáprico/caprílico (Miglyol[®] 810), ácido oleico e tributirina.

Um teste qualitativo foi proposto para a triagem desses óleos, sendo avaliada visualmente a capacidade de cada um em solubilizar as substâncias contidas nos extratos de ambas as própolis.

Para tanto, 4 mg de extrato de PV ou PVB foram misturados a 1 mL de cada óleo e o sistema foi submetido à agitação magnética constante por cerca de 1 h. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 25 μ L para a preparação de lâminas de microscopia, que foram observadas em microscópio de luz polarizada (Axioplan 2 Imaging, Carl Zeiss®) com magnificação de 32x para a avaliação da presença de cristais nas amostras.

4.2.3 Seleção do componente estabilizante

Após a definição do óleo que melhor se adequasse à proposta, foram testadas formulações piloto com dois estabilizantes poliméricos, Pluronic® F68 ou Kolliphor® P 407, ambos a 1%, afim de verificar o impacto destes tensoativos no tamanho e PdI das nanoestruturas.

4.2.4 Otimização do processo por *Box Behnken Design* (BBD)

Um delineamento experimental do tipo *Box Behnken Design* (BBD) foi realizado a fim de se obter uma formulação final de nanocápsulas carregadas com os extratos de PV ou PVB que apresentassem as características de diâmetro e índice de polidispersão (PdI) desejados, selecionadas como variáveis dependentes do processo. Utilizando o *software* Minitab 18® foi possível obter 15 sugestões de formulações contendo 2 mg/mL de PV ou PVB que contemplassem as variáveis independentes concentração de polímero, estabilizante e óleo (Tabela 1) em 3 níveis.

Tabela 1 - Variáveis independentes utilizadas no processo de otimização de formulação por *Box Behnken Design*

| Variáveis independentes | Limites | | |
|-------------------------|---------------|-----------|---------------|
| | Inferior (-1) | Médio (0) | Superior (+1) |
| Polímero (mg) | 30 | 75 | 120 |
| Estabilizante (%) | 0,6 | 0,9 | 1,2 |
| Óleo (mg) | 20 | 40 | 60 |

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.3.1 Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico (*Z-average*) e o PDI das nanopartículas foram obtidos pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS), utilizando o equipamento Zetasizer Nano[®] ZS90 (Malvern), com laser de 632,8 nm e detector posicionado a 173 °. O potencial zeta foi determinado a partir do Zetasizer Nano[®] Z (Malvern) pela técnica de espalhamento de luz eletroforético (*Electroforetic Light Scattering* - ELS). As suspensões de nanopartículas foram diluídas em solução de cloreto de potássio (KCl) 1 mM para as análises de DLS e ELS, que foram realizadas em triplicata.

A técnica de DLS baseia-se no princípio de que partículas são capazes de espalhar a luz de um laser incidida sobre as mesmas e que estas, quando em suspensão, permanecem em um movimento desordenado e constante, denominado movimento Browniano, que depende da temperatura e viscosidade do meio onde estão inseridas e varia com o tamanho dessas estruturas (ELOI; ABRIATA; MARCHETTI, 2021). Assim, a técnica de DLS consiste na emissão de um feixe de luz que interage com a amostra e o detector capta a intensidade das flutuações da luz espalhada pelas partículas em função do tempo, permitindo assim a obtenção do diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas, que engloba o tamanho da sua estrutura em si, íons adsorvidos à sua superfície e a capa de estabilização formada pelas cadeias hidrofílicas do tensoativo (ARLUISON; WIEN, 2020; ELOI; ABRIATA; MARCHETTI, 2021). As flutuações do espalhamento da luz são correlacionadas ao diâmetro hidrodinâmico (*d*) das partículas pelo *software* do equipamento através da Equação 2, de Stokes-Einstein (KATO et al., 2010):

$$d = k_b T / 3\pi\eta D \quad (2)$$

Onde: *d*: diâmetro hidrodinâmico; *k_b*: constante de Boltzmann; *T*: temperatura; *η*: viscosidade do solvente; *D*: coeficiente de difusão das partículas.

A técnica de ELS também se baseia no movimento Browniano das nanopartículas, refletindo a carga superficial dessas estruturas, ou seja, a carga medida na camada de cisalhamento da partícula em suspensão quando aplicado um campo elétrico (BHATTACHARJEE, 2016), representando um dos parâmetros para a avaliação da sua estabilidade ao longo do tempo.

4.3.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

O comportamento térmico das nanopartículas e de seus componentes (extratos de PV e PVB, PLA e Kolliphor[®] P407) foi avaliado pela técnica de *Differential Scanning Calorimetry*

(DSC) em calorímetro DSC-50 (Shimadzu) utilizando porta-amostra padrão de alumínio selado, sendo as análises realizadas em atmosfera de nitrogênio (50 mL/min.) com taxa de aquecimento de 10 °C/ min. Foram utilizadas como amostras as NC-B, NC-PV e NC-PVB, os extratos de PV e PVB previamente liofilizados, o polímero PLA e o estabilizante Kolliphor® P 407.

4.3.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A análise de rastreamento de nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis* - NTA) foi realizada para avaliar o diâmetro das nanocápsulas e a quantidade de nanopartículas em suspensão por unidade de volume (mL). As amostras de NC-B, NC-PV e NC-PVB foram diluídas em água purificada para as análises, sendo produzidos 5 vídeos para cada uma. O equipamento utilizado foi o NanoSight NS300 (Malvern) equipado com laser vermelho (642 nm) e as amostras foram processadas pelo *software* NTA 3.1. A partir dos dados de NTA, foi calculado o índice de Span, utilizando a Equação 3 (Nobbmann, 2016):

$$\text{Span} = D90 - D10 / D50 \quad (3)$$

Onde: Span: índice de polidispersão da amostra; D90: tamanho de 90% da população contida na amostra; D10: tamanho de 10% da população contida na amostra; D50: tamanho de 50% da população contida na amostra.

4.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das nanocápsulas foi determinada pelas imagens obtidas por meio do microscópio eletrônico JEM-100CX II (Jeol) através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As amostras de NC-PV e NC-PVB foram diluídas em água purificada e filtradas em filtro de *nylon* 0,22 µm com posterior aplicação em grades de malha de cobre com filme de carbono e fixação por secagem ao ar por 5 a 10 min. O excesso de amostra foi então removido por papel absorvente e estas foram contrastadas com acetato de uranila 1% durante cerca de 10 minutos. O diâmetro das nanopartículas foi medido utilizando o *software* Image J empacotado com Java 1.8.0_172, utilizando pelo menos 150 partículas.

4.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA PV

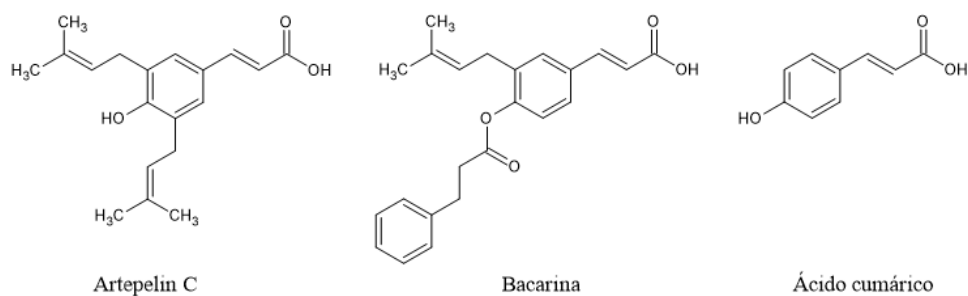
4.4.1 Desenvolvimento do método de análise

Com o objetivo de avaliar a eficiência de encapsulamento dos principais marcadores da PV na formulação de nanocápsulas proposta, foi desenvolvida uma metodologia de análise quantitativa por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrômetro de massas Single Quadrupole (SQ) com fonte de ionização por eletrospray (ESI) (UPLC-MS, Waters™), com posterior validação da mesma.

Para as análises, foi utilizada coluna cromatográfica (Acquity UPLC BEH C18, 1,7 μ m, 2,1 mm x 100 mm) acoplada à uma pré-coluna (*Pre-Column* 2,1 x 5 mm, VanGuard™) aquecida a 40°C, sendo o amostrador mantido constantemente a 5°C. O processamento dos dados foi realizado utilizando o *software* MassLynx (versão 4.2). Foram empregados solventes orgânicos de grau cromatográfico e água ultrapurificada obtida por ultra purificador *Master System* MS2000 (Gehaka). Todas as soluções mãe preparadas para as análises foram filtradas em filtro de *nylon* 0,22 μ m (Analítica).

Como analitos, foram selecionados padrões isolados de PV artepelin C, bacarina e ácido cumárico (Figura 10), cedidos pelas equipes dos pesquisadores Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos (FCFRP) e Prof. Dr. Sérgio Ricardo Ambrósio da Universidade de Franca (UNIFRAN). De modo a otimizar o sinal desses padrões, soluções a 1 μ g/mL em metanol de cada padrão foram infundidas no analisador de massas em água:acetonitrila (50:50) com 0,1% (v/v) de ácido fórmico ou 0,1% (m/v) de acetato de amônio, sendo que essas propostas de aditivos estão em conformidade com dados coletados na literatura (FUNARI; FERRO, 2006; ANDRADE et al., 2017; SEIBERT et al., 2019) e em experiências anteriores da equipe do laboratório.

Figura 10 – Estrutura química dos três padrões utilizados no desenvolvimento do método para análise da eficiência de encapsulamento da PV por UPLC-MS



Fonte: Adaptado de HATA et al., 2012.

Na sequência, foram realizadas análises cromatográficas dos três analitos em diferentes concentrações avaliando a razão massa carga (m/z) de interesse em modo *Selected Ion Recording* (SIR) ajustado, permitindo a identificação dos seus tempos de retenção (t_r) característicos. Diferentes composições iniciais de gradiente e vazões de fase móvel foram testadas para auxiliar na escolha das melhores condições analíticas.

4.4.2 Validação

As etapas do desenvolvimento e validação do método analítico foram baseadas nas orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agências regulatórias internacionais e literatura científica (ICH, 1995; ICH, 1996; COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002; KRUIVE et al., 2015a; KRUIVE et al., 2015b; BRASIL, 2017; MARSON et al., 2020; FDA, 2020). Os parâmetros analisados no processo de validação foram seletividade, linearidade e faixa de trabalho, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e robustez.

4.4.2.1 Linearidade

Os três compostos fenólicos foram solubilizados em metanol na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, a partir das quais foram preparadas diluições a 10 $\mu\text{g/mL}$. Essas soluções foram então diluídas em água: acetonitrila (95:5) para o preparo de soluções de cinco concentrações de cada analito para a construção das curvas de calibração, em triplicata, que foram obtidas por método dos mínimos quadrados. A faixa de trabalho foi escolhida de acordo com a sensibilidade de cada analito às condições analíticas pré-estabelecidas.

4.4.2.2 Seletividade

Considerando a aplicabilidade do método, os possíveis interferentes que influenciariam na seletividade deste seriam os demais componentes da formulação de suspensão de nanopartículas que não os extratos de própolis. Dessa forma, o filtrado de NC-B juntamente com o conservante metilparabeno a 0,15 % adicionado à todas as suspensões foi utilizado como amostra. Os perfis cromatográficos do filtrado de NC-B foram comparados com cada um dos três padrões, em seus respectivos SIR, avaliando como resposta a intensidade de sinal obtido no mesmo t_r do artepelin C, bacarina e ácido cumárico.

4.4.2.3 Precisão e exatidão

A precisão do método foi determinada em termos de repetibilidade e precisão intermediária e a exatidão expressa como recuperação. De acordo com várias agências regulatórias, uma das maneiras de avaliar a precisão seria a partir dos resultados de triplicatas de três concentrações contempladas na faixa linear do método, baixa, média e alta, podendo ser expressa por meio do coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR), calculado conforme Equação 4:

$$\text{DPR} = \text{DP}/\text{CMD} \times 100 \quad (4)$$

Onde: DPR = desvio padrão relativo; DP = desvio padrão; CMD = concentração média determinada

Para determinar a exatidão, recomenda-se que sejam avaliados pelo menos três níveis de concentrações contempladas na faixa linear, em triplicata, podendo esta ser expressa por meio do erro sistemático (*bias*) relativo ou recuperação, que relaciona a concentração média experimental com a concentração teórica do analito, conforme a Equação 5, devendo também ser calculado o DPR para cada concentração, conforme descrito no parágrafo anterior (BRASIL, 2017; FDA, 2020; ICH, 1996; KRUYE et al., 2015a; MARSON et al., 2020):

$$\text{Recuperação} = \text{CME}/\text{CT} * 100 \quad (5)$$

Onde: CME = concentração média experimental; CT = concentração teórica

Com o objetivo de determinar ambos os parâmetros, foram analisadas soluções em triplicata de três concentrações contempladas na faixa linear do método (baixa, média e alta), como segue: artepelin C e ácido cumárico - 200, 300 e 400 ng/mL; e bacarina - 300, 400 e 500 ng/mL. As concentrações de cada um dos pontos em triplicata foram calculadas a partir de curvas de calibração preparadas no mesmo dia da análise, de modo a minimizar variações experimentais.

4.4.2.4 Limites de detecção e quantificação

Para o cálculo dos limites de detecção e quantificação foram utilizados os coeficientes angular e linear das equações obtidas a partir de triplicata da curva analítica utilizada para a determinação da linearidade do método.

Existem diferentes formas de se calcular o limite de detecção, sendo uma delas por meio de parâmetros obtidos a partir da curva analítica, utilizando a Equação 6 (BRASIL, 2017; ICH, 1996):

$$LD = 3,3 * \sigma / IC \quad (6)$$

Onde: LD = limite de detecção; σ = desvio padrão; IC = inclinação da curva

Quanto ao limite de quantificação, pode ser calculado por meio da Equação 7 (BRASIL, 2017; ICH, 1996):

$$LQ = 10 * \sigma / IC \quad (7)$$

Onde: LQ = limite de quantificação; σ = desvio padrão; IC = inclinação da curva

4.4.2.5 Robustez

A robustez foi verificada a partir de um planejamento fatorial geral do tipo 2³ obtido pelo *software* Minitab 19[®] com oito combinações das seguintes condições, em dois níveis (Tabela 2): quantidade de aditivo da fase móvel de 0,08 e 0,12%; temperatura da coluna cromatográfica a 38 e 42 °C; e vazão da fase móvel a 0,33 e 0,37 mL/min. Para cada experimento, foram avaliadas soluções em quintuplicata nas concentrações intermediárias de cada padrão: artepelin C e ácido cumárico a 300 ng/mL; bacarina a 400 ng/mL. Foram considerados como resposta o t_r e a área dos analitos.

Tabela 2 – Variáveis utilizadas para a determinação da robustez por planejamento fatorial geral

| Experimento | Acetato de amônio (%) | Temperatura da coluna (°C) | Fluxo (mL/min.) |
|--------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------|
| 2 | 0,08 | 38 | 0,37 |
| 3 | 0,08 | 42 | 0,37 |
| 4 | 0,08 | 42 | 0,33 |
| 6 | 0,08 | 38 | 0,33 |
| 1 | 0,12 | 38 | 0,37 |
| 5 | 0,12 | 42 | 0,33 |
| 7 | 0,12 | 42 | 0,37 |
| 8 | 0,12 | 38 | 0,33 |

4.5 METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA PVB

A eficiência de encapsulamento da PVB foi determinada a partir de metodologia analítica por UPLC/MS (WatersTM) com fonte de ionização por ESI (-) desenvolvida por Mello (MELLO, 2022). Para isso, foi utilizada uma coluna cromatográfica (Acquity UPLC BEH C18, 1,7µm, 2,1 mm x 100 mm) acoplada à uma pré-coluna (*Pre-Column* 2,1 x 5 mm, VanGuardTM), aquecida a 40 °C. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 11 minutos e o fluxo de fase móvel utilizado foi de 0,4 mL/min (MELLO, 2022). As análises foram processadas a partir do *software* MassLynx (versão 4.2). A seletividade do método em relação à formulação de nanocápsulas desenvolvida foi verificada conforme critérios descritos no item 4.4.2.2, considerando, nesse caso, o SIR dos padrões formononetina, biochanina A e vestitol, cedidos pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos (FCFRP) e ilustrados na Figura 11. O t_r , massa molar e m/z dos padrões estão na Tabela 3.

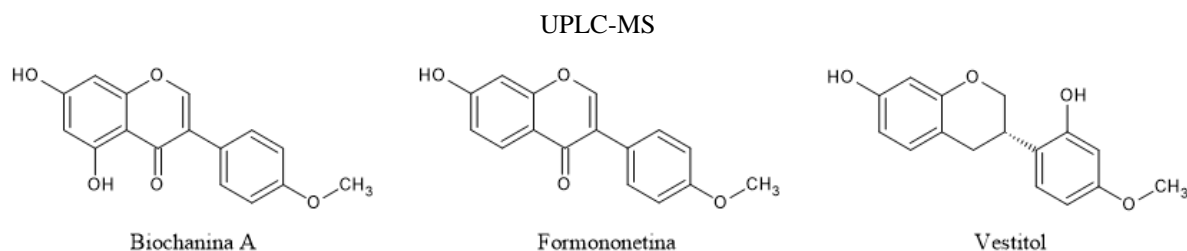
Tabela 3 – Tempo de retenção, massa molar e razão massa carga dos padrões formononetina, biochanina A e bacarina

| Padrão | t_r (min) | Massa molar (g/mol) | Razão massa carga (m/z) |
|---------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Formononetina | 2,98 ^a | 268,26 ^b | 267,00 ^a |
| Biochanina A | 3,26 ^a | 284,26 ^c | 283,00 ^a |
| Vestitol | 2,97 ^a | 272,30 ^d | 271,00 ^a |

Onde: t_r : tempo de retenção.

Fonte: ^aMELLO, 2022; ^bSciFinder, 2021d; ^cSciFinder, 2021e; ^dSciFinder, 2021f.

Figura 11 - Estrutura química dos padrões utilizados para análise da eficiência de encapsulamento da PVB por



Fonte: Adaptado de BERRETTA et al., 2017.

4.6 AVALIAÇÃO DOS EXTRATOS DE PV E PVB E DAS EFICIÊNCIAS DE ENCAPSULAMENTO

Inicialmente foram determinadas as quantidades de artepelin C, bacarina e ácido cumárico no extrato de PV e de formononetina, biochanina A e vestitol no extrato de PVB. Para isso, uma solução metanólica de PV ou PVB a 1 mg/mL foi diluída em água: acetonitrila (95:5) ou metanol, respectivamente, até concentrações adequadas para a quantificação de cada padrão, permitindo o cálculo da sua concentração e percentual na amostra. A partir desses dados, foi possível o cálculo da eficiência de encapsulamento das amostras de nanopartículas pelo método indireto. Para isso, as suspensões de NC-PV ou NC-PVB foram centrifugadas a 5000 FCR por 5 minutos em sistema de filtração Amicon[®], em triplicata, sendo cada um dos marcadores quantificados nos ultrafiltrados pelos métodos de UPLC-MS validados. A eficiência de encapsulamento (EE %) foi calculada conforme a Equação 8:

$$EE \% = \{([marcador]_{inicial} - [marcador]_{solução\ filtrada})/[marcador]_{inicial}\} \times 100 \quad (8)$$

Onde: EE %: eficiência de encapsulamento

4.7 ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

Os parâmetros selecionados para a análise da estabilidade das formulações desenvolvidas ao longo do tempo foram diâmetro hidrodinâmico, PDI, potencial zeta, pH e eficiência de encapsulamento. As NC-B, NC-PV e NC-PVB, produzidas em triplicata, foram mantidas sob refrigeração (4°C) durante todo o período de desenvolvimento do projeto.

4.8 PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO

O estudo do perfil de liberação *in vitro* dos extratos de PV e PVB a partir das NC-PV e NC-PVB foi realizado por diálise em membrana de acetato de celulose tendo por base a quantificação dos compostos majoritários dos extratos de PV (artepelin C) e PVB (formononetina) no meio de dissolução pelos métodos de UPLC/MS citados nos itens 4.4.1 e 4.5.

4.8.1 Determinação da condição *sink* e seletividade dos métodos

O ensaio de saturação foi conduzido em solução de tampão fosfato 0,03 M (pH 7,4) com diferentes concentrações de Tween 80. Para tanto, 20 mg dos extratos de PV e PVB foram

adicionados em 10 mL de tampão fosfato com e sem 0,5 e 0,2% (m/v) de Tween 80, respectivamente, para que fosse possível verificar se a adição de tensoativo ao meio receptor proporcionaria uma melhor quantificação dos marcadores. O sistema permaneceu sob agitação magnética por 24h em temperatura ambiente, período após o qual as amostras foram filtradas em filtro de *nylon* 0,22 μm e quantificadas com base nos marcadores selecionados por UPLC-MS conforme metodologias descritas nos itens 4.4 e 4.5. A seletividade das metodologias de análise foi avaliada conforme descrito no item 4.4.2.2 com relação aos meios de liberação utilizados.

4.8.2 Perfil de liberação de artepelin C e formononetina

Para a determinação dos perfis de liberação de artepelin C e formononetina das NC-PV e NC-PVB, respectivamente, membranas de diálise foram hidratadas em água ultrapurificada a 60 – 70 °C em três ciclos de 10 min. com troca da água a cada etapa.

Alíquotas de 1 mL de NC-PV ou NC-PVB foram adicionados aos sacos de diálise, conforme ilustrado na Figura 12, sendo estes inseridos em 30 mL do meio de liberação escolhido para manter a condição *sink* do experimento: tampão fosfato pH 7,4 com adição de 0,5% (m/v) de Tween 80 para artepelin C e 0,2% (m/v) para formononetina. Os sistemas foram mantidos sob agitação magnética constante (cerca de 500 rpm) e temperatura de 25 °C por até 24 h, sendo coletados 300 μL de meio de liberação em tempos pré-definidos: 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h. O volume retirado de amostra foi repostado manualmente com o respectivo meio receptor. As amostras foram filtradas em filtro de *nylon* 0,22 μm e o artepelin C e a formononetina foram quantificados por UPLC-MS conforme metodologias descritas nos itens 4.4.1 e 4.5, sendo o ensaio conduzido em triplicata. As quantidades liberadas dos marcadores em ng/mL foram calculadas de acordo com a Equação 9:

$$Q_{\text{real},t} = C_{\text{mensurada},t} \cdot V_r + V_a \cdot \sum^{n-1} C_a \quad (9)$$

Onde:

$Q_{\text{real},t}$: quantidade real liberada acumulada no tempo t ;

$C_{\text{mensurada},t}$: concentração mensurada na coleta no tempo t ;

V_r : volume de meio receptor;

V_a : volume de amostra removido;

$\sum^{n-1} C_a$: somatório da concentração de amostra removida nos tempos anteriores.

Figura 12 – Sistema utilizado para a determinação do perfil de liberação de artepelin C e formononetina a partir das nanocápsulas contendo os extratos de própolis verde e vermelha brasileira (NC-PV e NC-PVB)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os percentuais de artepelin C e formononetina liberados com o tempo das nanocápsulas foram calculados com base na quantidade teórica dos marcadores presentes em 1 mL de formulação, 185,40 µg de artepelin C e 131,60 µg de formononetina. Esses valores foram testados em cinco modelos cinéticos de liberação a partir de cálculos matemáticos realizados pelo *software* Microsoft Excel conforme equações exibidas na Tabela 4 (SAMAHA; SHEHAYEB; KYRIACOS, 2009; MENDES, 2019), sendo escolhido o modelo que apresentasse o maior valor de coeficiente de correlação linear (R^2).

Tabela 4 – Equações e gráficos para avaliação do melhor modelos cinético aplicados ao perfil de liberação de artepelin C e formononetina a partir das nanocápsulas contendo os extratos de própolis verde e vermelha brasileira (NC-PV e NC-PVB)

| Modelo cinético | Equações | Gráfico |
|-------------------------------|-----------------------------------|---|
| Ordem zero ^a | $Q_t = Q_0 + K_0 t^*$ | Quantidade acumulada de fármaco liberado x tempo |
| Primeira ordem ^b | $\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t^*$ | Log da quantidade acumulada de fármaco liberado x tempo |
| Korsmeyer-Peppas ^c | $Q_t/Q_\infty = K_{kp} t^{n^*}$ | Log da quantidade acumulada de fármaco liberado x log do tempo |
| Higuchi ^d | $Q_t = K_h \sqrt{t^*}$ | Quantidade acumulada de fármaco liberado x raiz quadrada do tempo |
| Hixson-Crowell ^e | $W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_s t^*$ | Raiz cúbica da fração não liberada de fármaco x tempo |

*Onde:

Q_t : quantidade de fármaco liberada no tempo t ;

Q_0 e W_0 : quantidade inicial de fármaco;

t : tempo;

aK_0 : constante da cinética de ordem zero;

bK_1 : constante da cinética de primeira ordem;

$^cQ_\infty$: quantidade de fármaco liberada após $t = \infty$;

$^cQ_t/Q_\infty$: fração da quantidade de fármaco liberada no tempo t ;

$^cK_{kp}$: constante da velocidade de liberação de Korsmeyer;

cn : expoente difusional ou de liberação;

dK_h : constante de dissolução de Higuchi;

eW_t : quantidade não liberada (remanescente) de fármaco no tempo t ;

eK_s : constante da relação superfície-volume.

4.9 AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS LIVRES E ENCAPSULADOS

4.9.1 Linhagens celulares e condução dos ensaios

Para os estudos de citotoxicidade dos extratos de própolis livres em comparação aos encapsulados foram selecionadas células metastáticas de câncer de próstata da linhagem PC-3 e células humanas normais de fibroblastos da linhagem 3T3, todas provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em cultura contínua com repiques periódicos até atingirem a confluência adequada (cerca de 80%).

O cultivo das linhagens PC-3 e 3T3 foi realizado em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) *high glucose* (Sigma Aldrich) contendo 1% de antibiótico (penicilina-streptomomicina) e 1800 mg/L de bicarbonato de sódio e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), sendo as células desprendidas do frasco de cultura celular utilizando solução de tripsina-EDTA 1X diluída em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) 1X. Todas as células foram mantidas em incubadora MCO-170AICUVDL-PA (Panasonic) a 37°C sob atmosfera úmida e 5% de CO₂.

Para a realização dos ensaios, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços inoculando 2×10^4 células/ poço a partir da contagem de uma alíquota de suspensão celular com quantidade equivalente de solução de Azul de Tripán (0,4% v/v) em câmara de Neubauer, excluindo as células que incorporaram o corante. As placas contendo as células foram incubadas por 24h nas mesmas condições citadas anteriormente.

As células foram tratadas com concentrações crescentes dos extratos de PV e PVB livres e encapsulados (NC-PV e NC-PVB) e com quantidades proporcionais de NC-B em meio de cultura DMEM suplementado com 2% de SBF. Como tratamentos, foram utilizados intervalos de concentrações de 10 a 200 µg/mL de PV e NC-PV e de 1 a 70 µg/mL de PVB e NC-PVB, valores esses estabelecidos em ensaios anteriores utilizados como triagem. A viabilidade celular foi avaliada por ensaios de captura do corante vermelho neutro (ISO, 2009) e quantificação de ácidos nucleicos (CORRÊA et al., 2005) após 24h para ambas as linhagens celulares e também 48h para a linhagem PC-3. Os extratos de PV e PVB utilizados nos ensaios foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em proporções adequadas para uma concentração máxima de 0,5% de DMSO nos poços (ISO, 2009).

Foram utilizados como controle negativo de citotoxicidade meio de cultura DMEM suplementado com 2% de SBF e o mesmo meio acrescido de 20% de DMSO como controle positivo.

4.9.2 Viabilidade celular por ensaio de captura do corante vermelho neutro

Os tratamentos contidos nos poços foram removidos e então foi adicionado meio de cultura contendo vermelho neutro (50 µg/mL). Inicialmente foi preparada uma solução de vermelho neutro a 4 mg/mL em água purificada, mantida em estufa a 30°C *overnight* para a completa solubilização dos cristais; essa solução foi filtrada em filtro de *nylon* 0,22 µm e diluída na proporção 1:79 (solução de vermelho neutro: meio de cultura), com concentração final de 50 µg/mL. As células foram incubadas por 3h nas mesmas condições citadas anteriormente (ISO, 2009).

Após o período de incorporação do corante nos lisossomos das células viáveis, o meio foi cuidadosamente retirado e as placas foram lavadas com 100 µL de PBS 1X por duas vezes. Em seguida, 200 µL de solução reveladora (50% de etanol, 1% de ácido acético glacial e água purificada q.s.p 100 mL) foram adicionadas aos poços. As placas foram manualmente agitadas e as absorbâncias das soluções foram determinadas em leitor de microplacas (SPECTRAMax, Molecular Devices) em 540 nm (ISO, 2009). A solução reveladora foi então removida e as placas foram lavadas novamente com PBS 1X e armazenadas até posterior quantificação de dupla fita de DNA (dsDNA) das células aderidas às placas.

4.9.3 Viabilidade celular por quantificação de ácidos nucleicos

Para a realização do ensaio de quantificação de ácidos nucleicos nas células viáveis remanescentes, foram adicionados 30 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M em cada poço e as placas foram mantidas em estufa a 30 °C por 1h 30 min (CORRÊA et al., 2005). Alíquotas de 2 µL de cada poço foram utilizadas para a quantificação de ácidos nucleicos do tipo dsDNA em equipamento *NanoDrop Lite Spectrophotometer* (Thermo Scientific). A quantificação das duplas fitas de DNA (dsDNA) foi realizada utilizando a razão de absorvância 260/280 nm e uma modificação da lei de Beer-Lambert, conforme Equação 10 (THERMO SCIENTIFIC, 2010; GARCÍA-ALEGRÍA et al., 2020), sendo os resultados obtidos em ng/µL:

$$c = (A * \epsilon) / b \quad (10)$$

Onde: c: concentração de ácidos nucleicos em ng/mL; A: absorvância; ϵ : coeficiente de extinção específico para o comprimento de onda (50); b: comprimento do caminho óptico em cm.

4.9.4 Análise estatística

Os ensaios de citotoxicidade dos extratos de própolis livres e encapsulados foram conduzidos em dois a três experimentos independentes. Os gráficos de viabilidade celular e os valores de metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) foram calculados pelo *software GraphPad Prism*®5. A viabilidade celular foi obtida a partir da Equação 11:

$$y = [(Y - CP) / (CN - CP)] * 100 \quad (11)$$

Onde: y: viabilidade celular em porcentagem (%); Y: resposta (absorvância); CP: controle positivo; CN: controle negativo.

Após a conversão das concentrações em logaritmo (log) e das absorvâncias em porcentagem de viabilidade celular, o IC₅₀ foi calculado a partir de análise por regressão não linear do tipo dose-resposta (log inibidor vs resposta – *variable slope*) com o uso do recurso *constrain (bottom constant equal to 0,0; top constant equal to 100,0)* e método de mínimos quadrados como *fitting*. A comparação estatística entre extrato livre e encapsulado para cada concentração foi feita por *Two-Way ANOVA* com pós teste de Bonferroni.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE PV E PVB

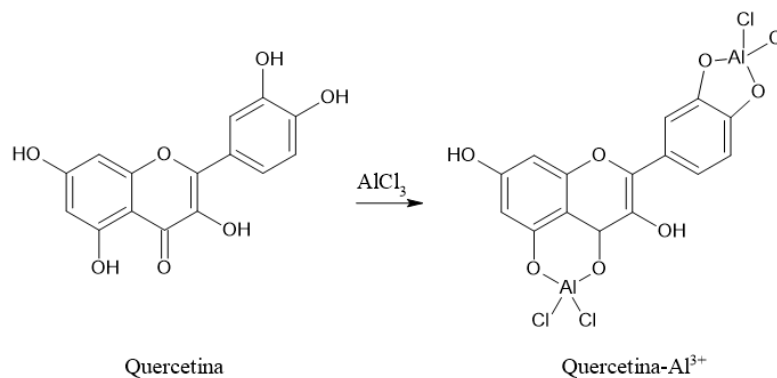
5.1.1 Teor de flavonoides totais

5.1.1.1 Padronização da técnica e obtenção das curvas de calibração

A determinação dos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides são requisitos para atestar a qualidade das própolis brasileiras estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2001). Os flavonoides e ácidos fenólicos são as principais categorias de compostos fenólicos responsáveis pelas atividades conhecidas da própolis, especialmente sua capacidade antioxidante e anticancerígena, sendo abundantes nesse tipo de material (PREMRATANACHAI; CHANCHAO, 2014; SALGUEIRO; CASTRO, 2016). Dentre os flavonoides, destacam-se substâncias como quercetina e crisina e especialmente as isoflavonas, presentes em maior quantidade em extratos de PVB, como a formononetina e biochanina A (BERRETTA et al., 2017; ZABAIYOU et al., 2017a).

A determinação da quantidade de flavonoides totais nos extratos de PV e PVB baseou-se na reação de complexação que ocorre entre os flavonoides e o íon alumínio (BERNARDI; NICOLINI; NICOLINI, 2017), conforme proposto inicialmente por Dowd (DOWD, 1959). Nesta análise, a quercetina, um dos flavonóis mais comuns, foi utilizado como controle positivo e sua reação com o Al^{3+} está ilustrada na Figura 13.

Figura 13 - Reação de complexação entre quercetina (flavonoide) e o íon alumínio (Al^{3+}).



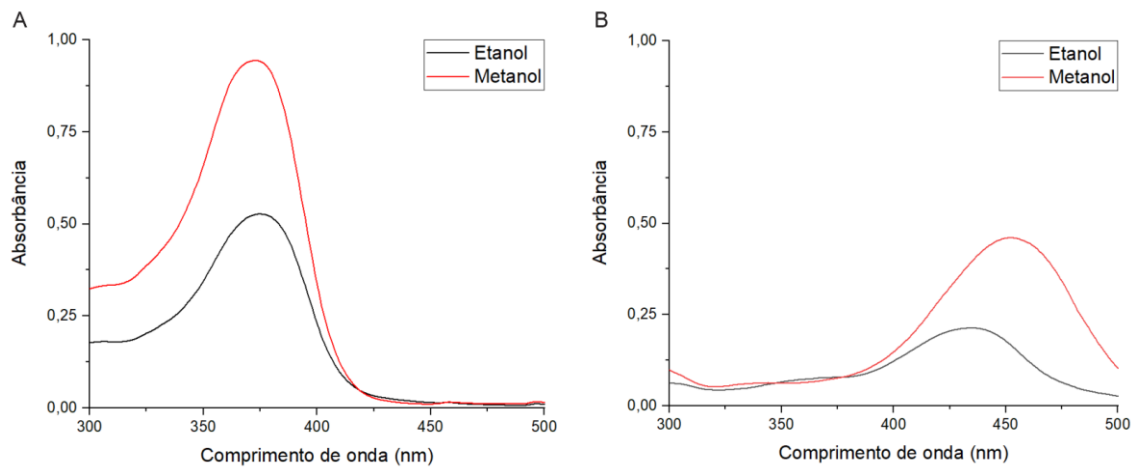
Fonte: Adaptado de PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012.

A partir dessa reação, ocorre um deslocamento batocrômico com a redução da principal banda de absorção da quercetina, entre 360 e 370 nm, e o surgimento de uma nova banda ao redor de 420 a 430 nm, indicando a formação do complexo quercetina-alumínio (BERNARDI; NICOLINI; NICOLINI, 2017). Isso possibilita a identificação dos flavonoides (especialmente flavonóis e flavonas) por espectrofotometria na região visível, sem interferência de outros compostos fenólicos presentes na amostra (WOISKY; SALATINO, 1998; FUNARI; FERRO, 2006; PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012).

Woisky e Salatino (1998) aplicaram essa reação pela primeira vez em amostras de própolis. Na ocasião, eles utilizaram quercetina como substância padrão em soluções metanólicas contendo 0,1% (m/v) de cloreto de alumínio, determinando a quantidade de flavonoides totais nas amostras após 30 minutos de reação em 425 nm (WOISKY; SALATINO, 1998). Anos mais tarde, Funari e Ferro (2006) prepararam suas soluções sob as mesmas condições, porém utilizando como solvente o etanol (FUNARI; FERRO, 2006). Na literatura ainda existem outras variações da aplicação dessa metodologia com relação ao solvente utilizado, o tempo e a quantidade de cloreto de alumínio necessários para a formação do complexo, bem como o comprimento de onda mais adequado. Sendo assim, a padronização de uma metodologia tornou-se necessária para obter resultados confiáveis.

Para padronizar a metodologia, primeiramente avaliou-se a influência do solvente orgânico na reação entre a quercetina e o Al^{3+} , sendo comparados os espectros de absorção de soluções de quercetina em etanol e metanol contendo ou não 0,1% de cloreto de alumínio. Conforme podemos observar na Figura 14 B, a banda de absorção característica do complexo quercetina-alumínio é formada tanto na presença de etanol como de metanol. Apesar das soluções em etanol apresentarem uma menor intensidade no pico de interesse em comparação às soluções metanólicas, a ocorrência do deslocamento batocrômico foi evidente (Figuras 14 A e B) e as curvas de calibração resultaram em um valor de R^2 maior do que 0,99, permitindo assim a sua utilização. Diante disso, optou-se por seguir a padronização utilizando o etanol como solvente orgânico por este ser menos tóxico.

Figura 14 - Espectro de absorção das soluções de quercetina em etanol e metanol (A) e quercetina e solução de cloreto de alumínio em etanol e metanol (B)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em seguida, foi avaliado o comprimento de onda com máxima absorção do complexo quercetina-alumínio, sendo obtido o valor de 440 nm, que foi então utilizado para os demais experimentos.

Por fim, foi padronizado o tempo de reação. Para tanto, foram construídas curvas de calibração do complexo quercetina-alumínio que foram lidas em 440 nm após 5, 15 ou 30 min. de reação. A partir da avaliação estatística dos resultados obtidos (Tabela 5), verificou-se a ocorrência de diferença significativa entre os tempos de 5 e 30 min. em três das cinco concentrações propostas (2, 6 e 8 $\mu\text{g/mL}$) e também foi observada uma tendência de queda nos valores das absorbâncias entre 15 e 30 min. nas maiores concentrações, sugerindo uma possível instabilidade do complexo com o passar do tempo. Desta forma, optou-se por utilizar o tempo intermediário de reação de 15 min.

Tabela 5 - Médias das absorvâncias obtidas para concentrações de 1 a 8 µg/mL após 5, 15 e 30 min. de reação entre quercetina e alumínio e análise estatística por ANOVA com pós teste de Tukey

| Concentração (µg/mL) | Absorvância nos tempos de reação | | | Análise estatística | |
|-------------------------|-------------------------------------|---------|---------|---------------------|---|
| | 5 | 15 | 30 | ANOVA (<i>p</i>)* | Teste de Tukey |
| | minutos | minutos | minutos | | |
| 1 | 0,067 | 0,056 | 0,058 | 0,0490* | diferença entre 5 e 15 min. |
| 2 | 0,130 | 0,129 | 0,120 | 0,0268* | diferença entre 5 e 30 min.; e entre 15 e 30 min. |
| 4 | 0,260 | 0,254 | 0,249 | 0,3009 | não há diferença entre os tempos |
| 6 | 0,377 | 0,370 | 0,361 | 0,0382* | diferença entre 5 e 30 min. |
| 8 | 0,469 | 0,463 | 0,454 | 0,0171* | diferença entre 5 e 30 min. |

**p* < 0,05: diferença significativa entre os grupos.

Assim, a metodologia de quantificação dos flavonoides totais nos extratos de PV e PVB foi padronizada com uso do solvente etanol, 0,1% de cloreto de alumínio, tempo de reação de 15 min. e leitura das amostras no comprimento de onda de 440 nm.

5.1.1.2 Avaliação do teor de flavonoides totais nos extratos de própolis

O teor de flavonoides totais encontrado nos extratos foi de 3,55% ± 0,14 para o extrato de PV e 6,13 % ± 0,42 para o extrato de PVB, sendo a comparação das médias das duas própolis significativamente diferentes pelo teste T (*p* < 0,0001).

Os resultados obtidos corroboram com estudos comparativos encontrados na literatura científica. Em trabalho realizado também com extratos de PV e PVB, Machado et al. encontraram maior quantidade de flavonoides em extratos etanólicos de PVB (57,60 e 58,19 mg EQ/g) em comparação com os extratos de PV (25,52, 39,90 e 46,80 mg EQ/g) (MACHADO et al., 2016), em concordância com Batista e colaboradores, que também obtiveram uma maior

quantidade de flavonoides em suas amostras de PVB (5,92%) do que as observadas no extrato de PV (4,5%) (BATISTA et al., 2012).

5.1.2 Teor de fenólicos totais

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de espécies vegetais cuja estrutura básica é constituída por uma hidroxila ligada à um anel aromático (ARAUJO et al., 2013; GUIMARÃES; SALGADO; CARVALHO, 2020). Dentro dessa categoria, destacam-se os ácidos fenólicos, como os ácidos *p*-cumárico, cinâmico, ferúlico e cafeico, artepelin C, bacarina e drupanina, e os flavonoides (SALGUEIRO; CASTRO, 2016; BERRETTA et al., 2017; ZABAIYOU et al., 2017).

Diversas metodologias colorimétricas podem ser utilizadas para quantificar esses compostos, sendo uma das mais difundidas a que utiliza o reagente de Folin Denis, uma mistura de tungstato de sódio, ácido fosfomolibdico e ácido fosfórico, cuja estrutura ácida formada reage com a hidroxila fenólica pela facilidade de redução do molibdênio, especialmente em meio alcalino (DO NASCIMENTO, 2008; GUIMARÃES; SALGADO; CARVALHO, 2020). O íon fenolato é oxidado e reduz o complexo formado pelos metais resultando na cor azul, apresentando um máximo de absorção em 760 nm (FUNARI; FERRO, 2006; DO NASCIMENTO, 2008). A adição de uma solução saturada de carbonato de sódio no meio reacional torna o meio alcalino, favorecendo a reação (FUNARI; FERRO, 2006; DO NASCIMENTO, 2008; GUIMARÃES; SALGADO; CARVALHO, 2020).

O teor de compostos fenólicos calculado para os extratos foi de $18,59\% \pm 0,53$ para o extrato de PV e $16,41\% \pm 0,21$ para o extrato de PVB, sendo as médias dos resultados das duas própolis significativamente diferentes pelo teste T ($p = 0,0207$). Machado et al. (2016), obtiveram um resultado contrário ao verificado por nós sendo observado maior quantidade de compostos fenólicos em amostras de extratos etanólicos de PVB em comparação com PV utilizando o método de Folin-Ciocalteu (MACHADO et al., 2016).

Além da variação de composição das própolis ao redor do mundo e pelo Brasil, diferenças do período de coleta das amostras, nos métodos de extração dos componentes de interesse e nas metodologias utilizadas para a determinação de fenólicos totais em extratos de própolis levam a divergências nos resultados de análise de teor desses compostos (ESCRICHE; JUAN-BORRÁS, 2018). Estudos que utilizam métodos mais sensíveis para a quantificação individual desse tipo de compostos, como técnicas de cromatografia líquida, mostram que a PV brasileira é formada em sua maioria por compostos do tipo fenólicos, especialmente ácidos

fenólicos e flavonoides (SUN et al., 2019). Dessa forma, é provável que o extrato de PV utilizado neste trabalho apresente um maior teor de compostos fenólicos totais pelo fato de terem na sua composição, além de flavonoides, a predominância de ácidos fenólicos, como artepelin C e bacarina.

5.1.3 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de própolis

Uma das formas de se mensurar a atividade antioxidante de uma substância é avaliar a sua capacidade em reduzir o radical DPPH. Essa reação pode ser observada pela mudança de cor da solução de roxo para amarelo, podendo ser medida a absorbância do radical em torno de 517 nm, que tende a ser menor quanto maior o potencial antioxidante do ativo em questão (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; HARB et al., 2016). O resultado pode ser expresso pela concentração efetiva da substância para reduzir 50% do DPPH (EC_{50}), conforme Tabela 6:

Tabela 6 - Valores de EC_{50} para o controle positivo (ácido ascórbico) e as amostras de própolis

| Substância | EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|------------------------------|---|
| Ácido ascórbico | $4,85 \pm 0,41$ |
| Própolis verde | $25,67 \pm 0,84$ |
| Própolis vermelha brasileira | $12,41 \pm 4,64$ |

Em outros estudos, amostras de extratos etanólicos de PV do Rio de Janeiro apresentaram EC_{50} entre 30,65 e 56,71 $\mu\text{g/mL}$ (SALGUEIRO; CASTRO, 2016), enquanto no Rio Grande do Norte os autores encontraram valores de 56,2 e 72,9 $\mu\text{g/mL}$ (FERREIRA et al., 2017). A composição da própolis, como já citado, pode variar em função da região onde é produzida e da época de coleta, apresentando diferentes quantidades dos seus compostos ativos majoritários, com possível variação de suas atividades biológicas, como o potencial antioxidante (SALGUEIRO; CASTRO, 2016; ANDRADE et al., 2017; REIS et al., 2019). Dessa forma, a avaliação da composição do extrato se torna essencial.

Machado e colaboradores avaliaram a atividade antioxidante de extratos etanólicos de PVB dos estados de Sergipe e Alagoas e PV do Paraná e de duas localidades diferentes de Minas Gerais, coletadas no ano de 2013 (MACHADO et al., 2016). No estudo em questão, as duas amostras de PVB apresentaram maior atividade antioxidante em comparação a dois dos três extratos etanólicos de PV avaliados (MACHADO et al., 2016), o que corrobora com os

resultados obtidos. Baseando-se no fato da amostra de PVB analisada apresentar quase o dobro de flavonoides e somente cerca de 2,2% a menos de compostos fenólicos em comparação com a PV, era esperado que ela apresentasse maior atividade antioxidante.

5.2 DESENVOLVIMENTO DA SUSPENSÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

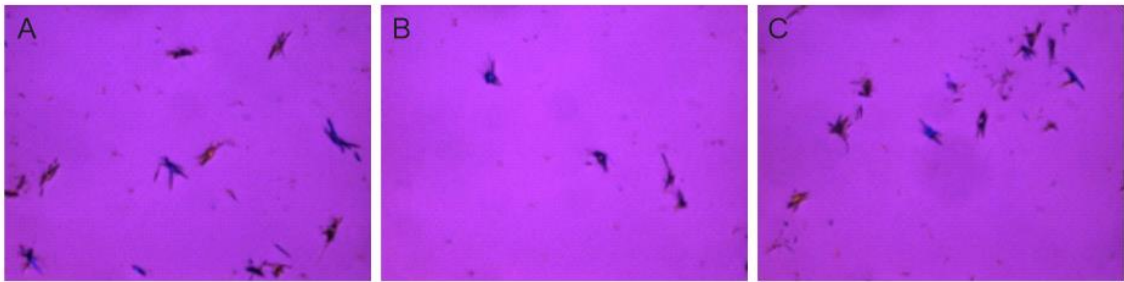
5.2.1 Seleção do componente oleoso

Em estruturas do tipo nanocápsulas, o núcleo, geralmente oleoso, permite a dissolução e veiculação de ativos de característica lipofílica no sangue, proporcionando uma maior biodisponibilidade dessas substâncias, além de poderem, por si só, serem biologicamente ativos (DENG et al., 2020). O procedimento de nanoencapsulação permite a preservação das propriedades tanto do fármaco quanto do óleo utilizados (FERREIRA; NUNES, 2019). O óleo ideal para uma formulação deve ser seguro para o uso pretendido e capaz de solubilizar o fármaco em questão (KAPUSCINSKA; OLEJNIK; NOWAK, 2016; DENG et al., 2020).

Microscopia com luz polarizada é uma técnica que pode ser utilizada para avaliar qualitativamente a presença de cristais em diversas amostras por meio da combinação de luz e filtros polarizadores (OLDENBOURG, 2013), sendo uma estratégia para o *screening* dos possíveis óleos que podem ser utilizados na obtenção de nanocápsulas, uma vez que permite observar se o fármaco tende ou não a se solubilizar no óleo proposto. Alguns estudos sugerem que uma maior afinidade do fármaco pelo componente lipídico utilizado tende a aumentar a sua eficiência de encapsulação (NII; ISHII, 2005).

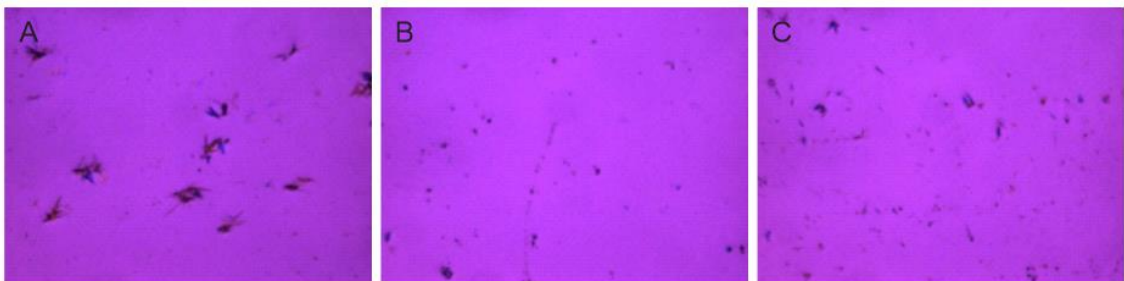
Para ambas as própolis, foi possível observar nas lâminas mais cristais quando utilizado o Miglyol[®] 810 se comparado aos outros dois óleos indicando uma baixa solubilidade dos extratos neste óleo, sendo, portanto, logo descontinuado. Em relação aos demais óleos (tributirina e ácido oleico) foram observados menos cristais e ambos apresentaram capacidade muito semelhante de solubilização dos componentes lipossolúveis da própolis (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Avaliação da presença de cristais em amostra de própolis vermelha brasileira nos óleos Miglyol® 810 (A), ácido oleico (B) e tributirina (C)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 - Avaliação da presença de cristais em amostra de própolis verde nos óleos Miglyol® 810 (A), ácido oleico (B) e tributirina (C)



Fonte: Elaborado pelo autor.

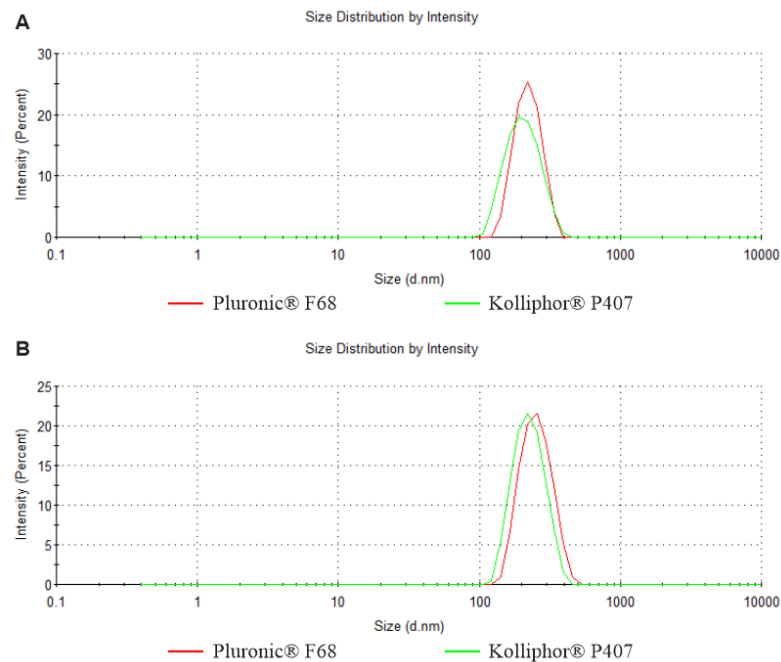
Na literatura científica, estudos apontam uma atividade citotóxica *in vitro* da tributirina em diversas linhagens de células de câncer de próstata (MAIER et al., 2000). Com relação ao ácido oleico, apesar de alguns estudos relatarem uma atividade antiproliferativa em células de vários tipos de câncer (JIANG et al., 2017), um estudo mais recente apontou um potencial indutor de proliferação de células do tipo PC-3 e DU-145 (LIOTTI et al., 2018). Sendo assim, devido aos resultados controversos para o desempenho do ácido oleico em relação ao câncer de próstata, a tributirina foi escolhida como componente oleoso da formulação proposta.

5.2.2 Seleção do componente estabilizante

Foram preparadas formulações piloto contendo os extratos de PV ou PVB e 1 % de Pluronic® F68 ou Kolliphor® P407 e comparados os seus diâmetros hidrodinâmicos em relação ao uso de um ou outro estabilizante. Para ambos os extratos, foi observado diâmetro menor e mais próximo ao tamanho alvo das formulações quando utilizado o Kolliphor® P 407 (NC-PVB: 195 nm; NC-PV: 216 nm) em relação ao Pluronic® F68 (NC-PVB: 217 nm; NC-PV: 242 nm),

conforme ilustrado nas Figuras 17 A e B, que mostram os gráficos de diâmetro por intensidade das formulações mencionadas.

Figura 17 – Gráficos de diâmetro por intensidade das nanocápsulas preparadas com 1% de Pluronic® F68 (curvas vermelhas) ou Kolliphor® P 407 (curvas verdes) contendo extrato de própolis vermelha brasileira (A) ou própolis verde (B)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Além do formato, as características de superfície das nanopartículas como, por exemplo, carga, presença de cadeias poliméricas ou de proteínas em sua superfície, assim como o tamanho das nanoestruturas influencia diretamente no seu comportamento biológico, biodistribuição, toxicidade, direcionamento e internalização celular, que geralmente é maior quanto menor a partícula (BANIK; FATTAHI; BROWN, 2016).

O surfactante não iônico poloxâmero 407 (Kolliphor® P 407) é um copolímero tribloco anfifílico, não tóxico e biodegradável, apropriado para promover liberação controlada em formulações administradas pela via pretendida neste projeto, a intravenosa (PEREIRA et al., 2013; FAKHARI et al., 2017). Apesar de o Pluronic® F68 também ser um poloxâmero (188), o Kolliphor® P 407 apresenta maior tamanho e peso molecular do que o primeiro, o que sugere que o poloxâmero 407 favoreceria um maior encapsulamento do fármaco nas nanopartículas (KAMEL; ABBAS; SHAFFIE, 2019; SHAARANI; HAMID; KAUS, 2017). Desta forma, o Kolliphor® P407 foi o estabilizante escolhido para a continuidade dos estudos de formulação.

5.2.3 Otimização do processo por *Box Behnken Design* (BBD)

Com o intuito de obter a composição mais adequada aos objetivos propostos e avaliar a influência das variáveis independentes nas variáveis de resposta de diâmetro hidrodinâmico e PdI, foram preparadas 12 formulações de nanocápsulas sugeridas pelo *software* além da triplicata do ponto central, totalizando 15 formulações, sendo a ordem de condução dos ensaios randomizada. Nanocápsulas com PVB foram obtidas com diâmetro entre 163 a 246 nm dependendo da composição utilizada, enquanto as nanocápsulas com PV apresentaram variação de 168 a 257 nm, todas com baixo PdI (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 - Variáveis dependentes e independentes das formulações contendo extrato de própolis verde propostas durante o planejamento experimental

| Ordem do ensaio | Número da formulação | Variáveis independentes | | | Variáveis dependentes | |
|-----------------|----------------------|-------------------------|----------|------------------|-----------------------------|------|
| | | Kolliphor® P 407 (%) | PLA (mg) | Tributirina (mg) | Diâmetro hidrodinâmico (nm) | PdI |
| 1 | 2 | 0,9 | 120 | 20 | 257 | 0,11 |
| 2 | 10 | 0,6 | 75 | 60 | 231 | 0,12 |
| 3 | 1 | 0,9 | 30 | 20 | 173 | 0,06 |
| 4 | 13 | 0,9 | 75 | 40 | 223 | 0,00 |
| 5 | 4 | 0,9 | 120 | 60 | 254 | 0,10 |
| 6 | 11 | 1,2 | 75 | 20 | 211 | 0,11 |
| 7 | 7 | 1,2 | 30 | 40 | 168 | 0,08 |
| 8 | 15 | 0,9 | 75 | 40 | 220 | 0,04 |
| 9 | 8 | 1,2 | 120 | 40 | 250 | 0,10 |
| 10 | 12 | 1,2 | 75 | 60 | 234 | 0,03 |
| 11 | 9 | 0,6 | 75 | 20 | 215 | 0,12 |
| 12 | 14 | 0,9 | 75 | 40 | 225 | 0,13 |
| 13 | 5 | 0,6 | 30 | 40 | 181 | 0,07 |
| 14 | 3 | 0,9 | 30 | 60 | 185 | 0,10 |
| 15 | 6 | 0,6 | 120 | 40 | 252 | 0,07 |

Onde: PLA: poli (ácido láctico); PdI: índice de polidispersão.

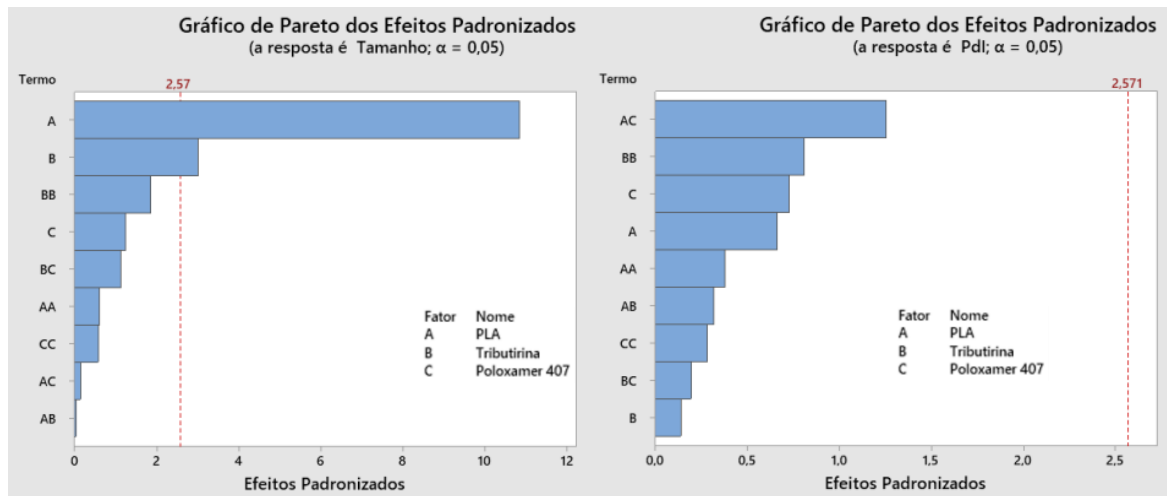
Tabela 8 - Variáveis dependentes e independentes das formulações contendo extrato de própolis vermelha brasileira propostas durante o planejamento experimental

| Ordem do ensaio | Número da formulação | Variáveis independentes | | | Variáveis dependentes | |
|-----------------|----------------------|-------------------------|----------|------------------|-----------------------------|------|
| | | Kolliphor® P 407 (%) | PLA (mg) | Tributirina (mg) | Diâmetro hidrodinâmico (nm) | PdI |
| 1 | 2 | 0,9 | 120 | 20 | 228 | 0,07 |
| 2 | 12 | 1,2 | 75 | 60 | 218 | 0,07 |
| 3 | 14 | 0,9 | 75 | 40 | 216 | 0,05 |
| 4 | 5 | 0,6 | 30 | 40 | 171 | 0,04 |
| 5 | 1 | 0,9 | 30 | 20 | 163 | 0,06 |
| 6 | 15 | 0,9 | 75 | 40 | 204 | 0,02 |
| 7 | 4 | 0,9 | 120 | 60 | 241 | 0,06 |
| 8 | 11 | 1,2 | 75 | 20 | 203 | 0,08 |
| 9 | 10 | 0,6 | 75 | 60 | 212 | 0,08 |
| 10 | 8 | 1,2 | 120 | 40 | 244 | 0,04 |
| 11 | 3 | 0,9 | 30 | 60 | 176 | 0,07 |
| 12 | 9 | 0,6 | 75 | 20 | 176 | 0,07 |
| 13 | 6 | 0,6 | 120 | 40 | 246 | 0,05 |
| 14 | 13 | 0,9 | 75 | 40 | 220 | 0,10 |
| 15 | 7 | 1,2 | 30 | 40 | 171 | 0,10 |

Onde: PLA: poli (ácido láctico); PdI: índice de polidispersão.

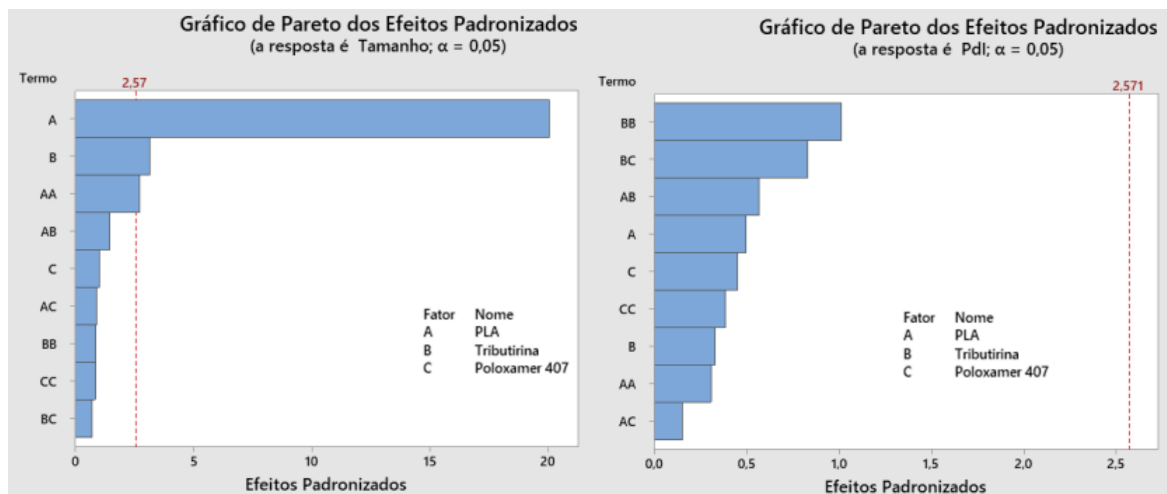
A partir dos gráficos de Pareto (Figuras 18 e 19), é possível observar que as variáveis polímero (PLA) e óleo (tributirina) foram as que influenciaram significativamente no tamanho da duas nanocápsulas; já o estabilizante, na faixa de concentração avaliada, não afetou o diâmetro das mesmas. Nenhuma variável apresentou efeito significativo no PdI das formulações.

Figura 18- Influência da concentração dos componentes da formulação contendo própolis vermelha brasileira nas variáveis de resposta tamanho e índice de polidispersão (PDI)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 19 - Influência da concentração dos componentes da formulação contendo própolis verde nas variáveis de resposta tamanho e índice de polidispersão (PDI)

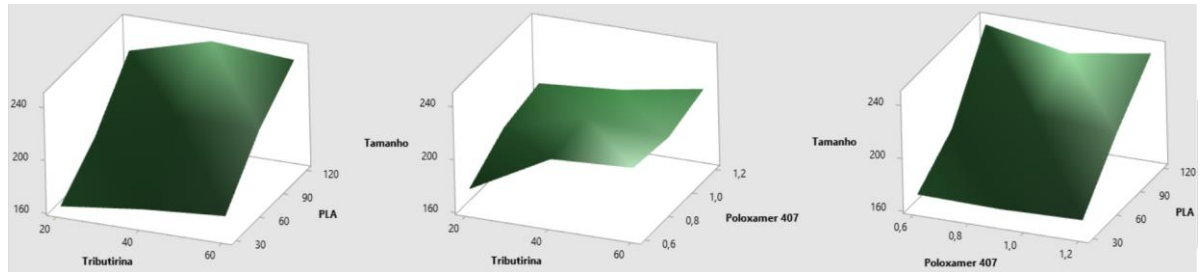


Fonte: Elaborado pelo autor.

Pelos gráficos de superfície pode-se observar um aumento de diâmetro com o aumento da concentração de polímero e óleo utilizado (Figuras 20 e 21). A concentração do polímero pode influenciar no tamanho das nanopartículas, sendo que o aumento da sua quantidade aumenta também a viscosidade da fase orgânica, o que reduz a velocidade da difusão do polímero do solvente para a fase aquosa, resultando em partículas maiores. Além disso, maior quantidade de polímero pode permitir encapsular maior quantidade de ativo (SHARMA et al., 2014; NASEF; GARDOUH; GHORAB, 2015). A adição crescente de óleo à formulação também pode tornar o sistema mais viscoso, gerando partículas maiores (CONTRI et al., 2013),

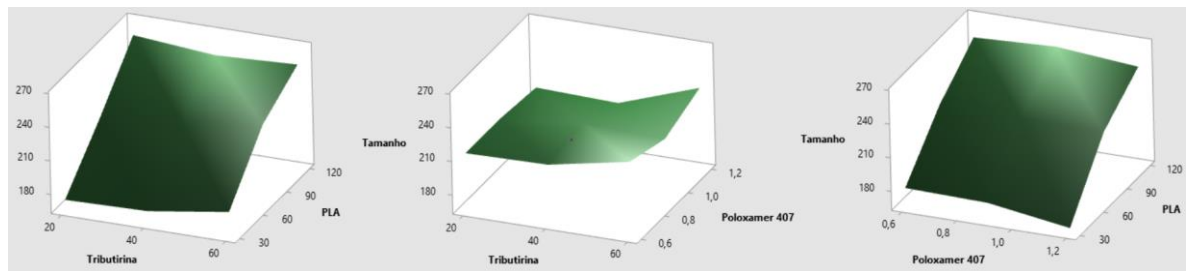
e proporcionar uma maior incorporação do fármaco à nanoestrutura, dependendo da sua afinidade pelo óleo em questão (CADETE et al., 2019).

Figura 20 – Gráficos de superfície obtidos através do planejamento experimental para própolis vermelha brasileira



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 - Gráficos de superfície obtidos através do planejamento experimental para própolis verde



Fonte: Elaborado pelo autor.

O efeito do tensoativo no tamanho das nanopartículas depende da sua quantidade. Uma quantidade insuficiente desse componente pode reduzir a estabilidade das partículas, favorecendo a sua agregação entre si (SHARMA et al., 2014). Ao aumentar a quantidade do tensoativo, a tensão superficial entre a gota e o meio tende a diminuir, o que leva a uma redução também do seu tamanho. Entretanto, a partir de uma certa concentração, o tensoativo não apresenta mais essa capacidade, e o tamanho da partícula tende a aumentar (NASEF; GARDOUH; GHORAB, 2015). No estudo que realizamos, não foi observada influência significativa da quantidade de tensoativo na faixa de concentração avaliada nas variáveis de resposta diâmetro e PdI, sendo possível utilizar qualquer uma das concentrações testadas.

A partir dos resultados obtidos pelo planejamento BBD e utilizando a calculadora do *software*, foi possível delinear uma mesma composição da nanocápsula para os dois extratos de própolis dentro dos parâmetros previamente estipulados (tamanho alvo de 180 nm e PdI minimizado). A formulação otimizada com os extratos de PV ou PVB foi composta por 0,23% de PLA (polímero), 0,4% de tributirina (óleo) e 1% de Kolliphor[®] P407 (tensoativo) e o

tamanho e PDI das nanocápsulas podem ser calculados a partir das equações de regressão em unidades não codificadas para PVB (Equações 11 e 12) e PV (Equações 13 e 14), como segue:

$$\begin{aligned} \text{Tamanho (nm)} = & 24,2 + 1,016 X_1 + 2,98 X_2 + 104 X_3 - 0,00139 X_1 * X_1 - 0,0218 X_2 * X_2 \\ & - 29,8 X_3 * X_3 + 0,00014 X_1 * X_2 - 0,046 X_1 * X_3 - 0,850 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (11)$$

$$\begin{aligned} \text{PDI} = & -0,006 + 0,00165 X_1 - 0,00153 X_2 + 0,058 X_3 - 0,000003 X_1 * X_1 \\ & + 0,000030 X_2 * X_2 + 0,046 X_3 * X_3 - 0,000005 X_1 * X_2 - 0,00131 X_1 * X_3 - 0,00046 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (12)$$

$$\begin{aligned} \text{Tamanho (nm)} = & 130,3 + 1,427 X_1 - 0,138 X_2 + 14,7 X_3 - 0,00377 X_1 * X_1 \\ & + 0,00599 X_2 * X_2 - 26,1 X_3 * X_3 - 0,00428 X_1 * X_2 + 0,178 X_1 * X_3 + 0,312 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (13)$$

$$\begin{aligned} \text{PDI} = & 0,145 - 0,00002 X_1 - 0,00127 X_2 - 0,108 X_3 + 0,000004 X_1 * X_1 + 0,000065 X_2 * \\ & X_2 + 0,110 X_3 * X_3 - 0,000016 X_1 * X_2 + 0,00028 X_1 * X_3 - 0,00342 X_2 * X_3 \end{aligned} \quad (14)$$

Onde: X₁: poli ácido láctico (PLA); X₂: tributirina; X₃: Kolliphor® P407.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

5.3.1 Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico representado pelo *Z-average*, PDI e potencial zeta médios das NC-PV, NC-PVB e NC-B estão descritos na Tabela 9:

Tabela 9 - *Z-average*, PDI e potencial zeta médios das nanocápsulas com e sem própolis

| Formulação | <i>Z-average</i> | PDI | Potencial zeta |
|------------|------------------|-------------|----------------|
| NC-B | 175 nm ± 8 | 0,08 ± 0,08 | - 5,6 mV ± 1,3 |
| NC-PV | 196 nm ± 6 | 0,11 ± 0,01 | -11,8 mV ± 0,2 |
| NC-PVB | 178 nm ± 6 | 0,08 ± 0,04 | -8,8 mV ± 1,2 |

Onde: *Z-average*: diâmetro hidrodinâmico médio; PDI: índice de polidispersão; NC-B: nanopartícula sem extrato de própolis; NC-PV: nanopartícula com extrato de própolis verde; NC-PVB: nanopartícula com extrato de própolis vermelha brasileira.

O tamanho e o PDI das nanoestruturas tem impacto direto no principal mecanismo de internalização celular desses sistemas, a endocitose (DANAIEI et al., 2018). O diâmetro alvo de 180 nm escolhido para as nanocápsulas foi baseado em dados da literatura que indicam que partículas com tamanho entre 150 e 200 nm, em conformidade com os resultados obtidos, tendem a permanecer na circulação sanguínea por um tempo mais prolongado do que partículas com diâmetro muito reduzido além de se acumularem no microambiente tumoral em decorrência do efeito EPR (DANAIEI et al., 2018; ELOI; ABRIATA; MARCHETTI, 2021). A

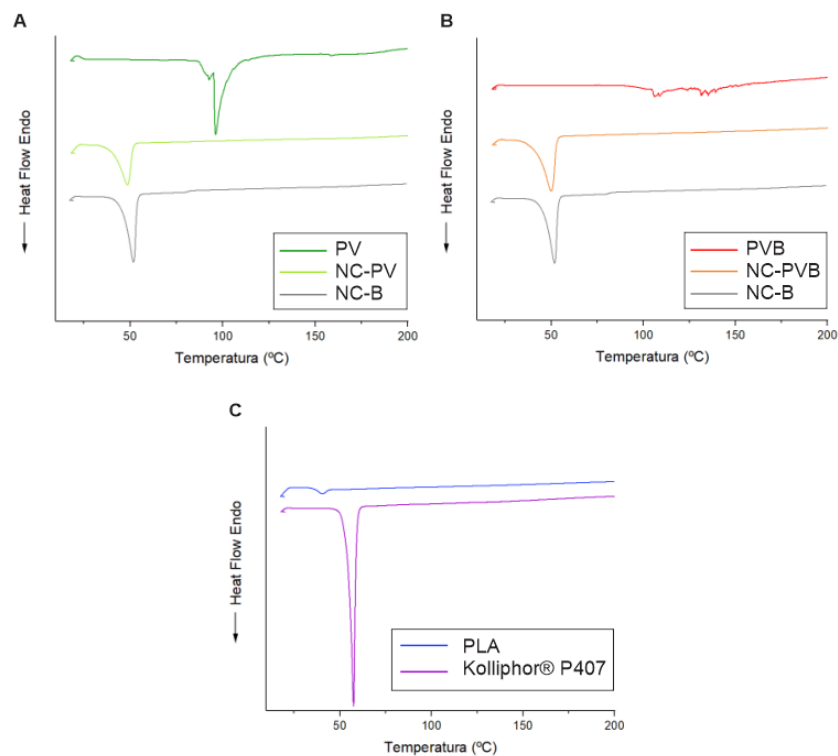
homogeneidade da distribuição de tamanhos das nanopartículas, representada pelo PDI, deve apresentar valores abaixo de 0,3, indicando uma população de nanoestruturas com baixa polidispersão (DANA EI et al., 2018). Dessa forma, considerando a faixa de PDI obtida (de 0,077 a 0,107), considera-se as suspensões de nanocápsulas desenvolvidas com baixa polidispersão a monodispersas.

Os valores negativos de potencial zeta obtidos se devem, possivelmente, à presença de grupamentos carboxílicos terminais nas cadeias do PLA (BRUSCHI et al., 2017; RACHMAWATI et al., 2016). Rachmawati et al. desenvolveram nanopartículas poliméricas contendo curcumina utilizando o polímero PLA e também obtiveram valores de potencial zeta negativos (RACHMAWATI et al., 2016).

5.3.2 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Os termogramas das nanopartículas, extratos de própolis, PLA e Kolliphor® P407 estão ilustrados na Figura 22. Os valores obtidos nas análises de DSC estão descritos na Tabela 10.

Figura 22 - Termogramas dos extratos livres e encapsulados de PV e PVB, NC-B, PLA e Kolliphor® P407



Onde: NC-PV: nanopartícula com extrato de própolis verde; PV: extrato de própolis verde; NC-B: nanopartícula sem extrato de própolis; NC-PVB: nanopartícula com extrato de própolis vermelha brasileira; PVB: extrato de própolis vermelha brasileira.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10 – Valores de temperatura e variação de entalpia (ΔH) das amostras analisadas por DSC

| Amostra | T (°C) | ΔH (J/g) |
|-----------------|---------------|------------------------------------|
| NC-PV | 48,66 | 54,7972 |
| PV | 96,41 | 79,9456 |
| NC-PVB | 49,95 | 77,4177 |
| PVB | - | - |
| NC-B | 52,66 | 70,2213 |
| PLA | 40,92 | 4,7695 |
| Kolliphor® P407 | 57,65 | 131,9477 |

Onde: T: temperatura de transição de fase; ΔH : variação de entalpia; NC-B: nanopartícula sem extrato de própolis; NC-PV: nanopartícula com extrato de própolis verde; NC-PVB: nanopartícula com extrato de própolis vermelha brasileira; PV: extrato de própolis verde; PVB: extrato de própolis vermelha brasileira; PLA: poli (ácido láctico).

A técnica de DSC permite quantificar a energia necessária para que ocorra a transição de fase induzida pela temperatura de um determinado material a partir da diferença do fluxo de calor entre essa amostra e um material de referência (THOMAS, 2017; CAÑADAS; CASALS, 2019; KOSHY; SUBRAMANIAN). A absorção de calor durante a transição de fase pelo material indica a ocorrência de um evento endotérmico que pode ser, por exemplo, devido a fusão dessa amostra (KOSHY; SUBRAMANIAN; THOMAS, 2017; JOBIN; ALVES, 2019), o que pode ser observado nos termogramas gerados.

O pico endotérmico próximo a 100 °C que aparece no extrato livre de PV pode ser decorrente da evaporação de água residual do extrato (DORNAS, 2018; REDONDO, 2018), uma vez que o mesmo apresentava cerca de 16 % de água, valor este obtido a partir da determinação do teor de sólidos no referido extrato por meio de Analisador de Umidade Avançado (MB120, Ohaus) com temperatura de secagem em torno de 105 °C. Já no extrato de PVB pode-se observar picos endotérmicos entre 115 e 135 °C que podem ser atribuídos a fusão de compostos fenólicos (DO NASCIMENTO et al., 2016; DORNAS, 2018). A ausência destes picos na NC-PVB sugere que os componentes do extrato podem estar em estado amorfo e molecularmente dispersos na estrutura das nanopartículas (RACHMAWATI et al., 2016).

O PLA exibiu uma temperatura de transição vítrea (T_g) próxima à 41 °C que não foi evidenciada nos termogramas das nanoestruturas. O tensoativo, por sua vez, apresentou um pico endotérmico em 57,65 °C. Em todas as nanocápsulas, foi observado um pico endotérmico próximo a 50 °C que pode ser referente à supressão da T_g do PLA relacionada ao efeito plastificante do tensoativo na matriz do polímero (MIRANDA et al., 2019).

5.3.3 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

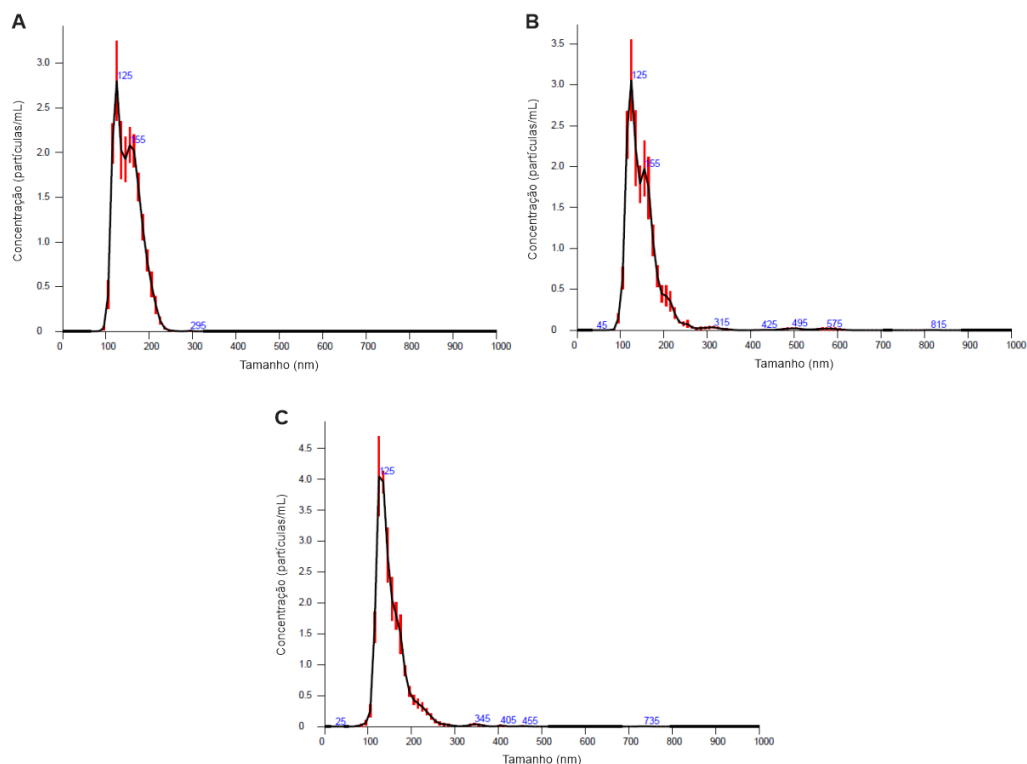
Os diâmetros hidrodinâmicos e a concentração de nanopartículas/mL das amostras analisadas estão descritas na Tabela 11 e os gráficos que mostram essa relação estão dispostos nas Figuras 23.

Tabela 11 – Diâmetro (nm), concentração (partículas/mL) e índice de Span das amostras de nanocápsulas analisadas pela técnica de rastreamento de nanopartículas (NTA)

| Partícula | Diâmetro (nm) | Concentração (partículas/mL) | Span |
|-----------|---------------|---|------|
| NC-B | 133 ± 7 | 1,80x10 ¹² ± 0,05x10 ¹² | 0,50 |
| NC-PV | 124 ± 3 | 1,79x10 ¹² ± 0,04x10 ¹² | 0,58 |
| NC-PVB | 134 ± 2 | 2,15x10 ¹² ± 0,09x10 ¹² | 0,54 |

Onde: NC-B: nanopartícula sem extrato de própolis; NC-PV: nanopartícula com extrato de própolis verde; NC-PVB: nanopartícula com extrato de própolis vermelha brasileira.

Figura 23 – Gráficos de concentração (nanopartículas/mL) por tamanho (nm) das amostras de nanocápsulas sem extrato (A) e com extratos de própolis verde (B) ou vermelha brasileira (C)



Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise de rastreamento de nanopartículas permite a caracterização de sistemas nanoestruturados em tempo real quanto ao tamanho e concentração de nanopartículas por

volume a partir da captação do espalhamento de luz dessas partículas de forma individual, captado por uma câmera acoplada a um microscópio a partir da incidência de um laser na amostra (WRIGHT, 2012; SLADEK et al., 2019). Esse método é mais preciso e complementar à técnica de DLS, especialmente para sistemas polidispersos (WILSON; WRIGHT, 2012; GREEN, 2017; SLADEK et al., 2019).

O diâmetro das nanopartículas obtido a partir da técnica de NTA tende a ser menor do que o calculado por DLS uma vez que esta última privilegia partículas maiores em detrimento das menores no cálculo do diâmetro médio (WRIGHT, 2012; WILSON; GREEN, 2017; RIBEIRO et al., 2018).

O índice de Span, mostrado na Tabela 13, é um indicativo da homogeneidade de tamanho das nanoestruturas contidas em uma amostra analisada pela técnica de NTA (RIBEIRO et al., 2018). Os números calculados, de 0,5 a 0,58, indicam uma distribuição de tamanho das nanopartículas com baixa polidispersão, em concordância com os valores de PDI obtidos nas análises de DLS.

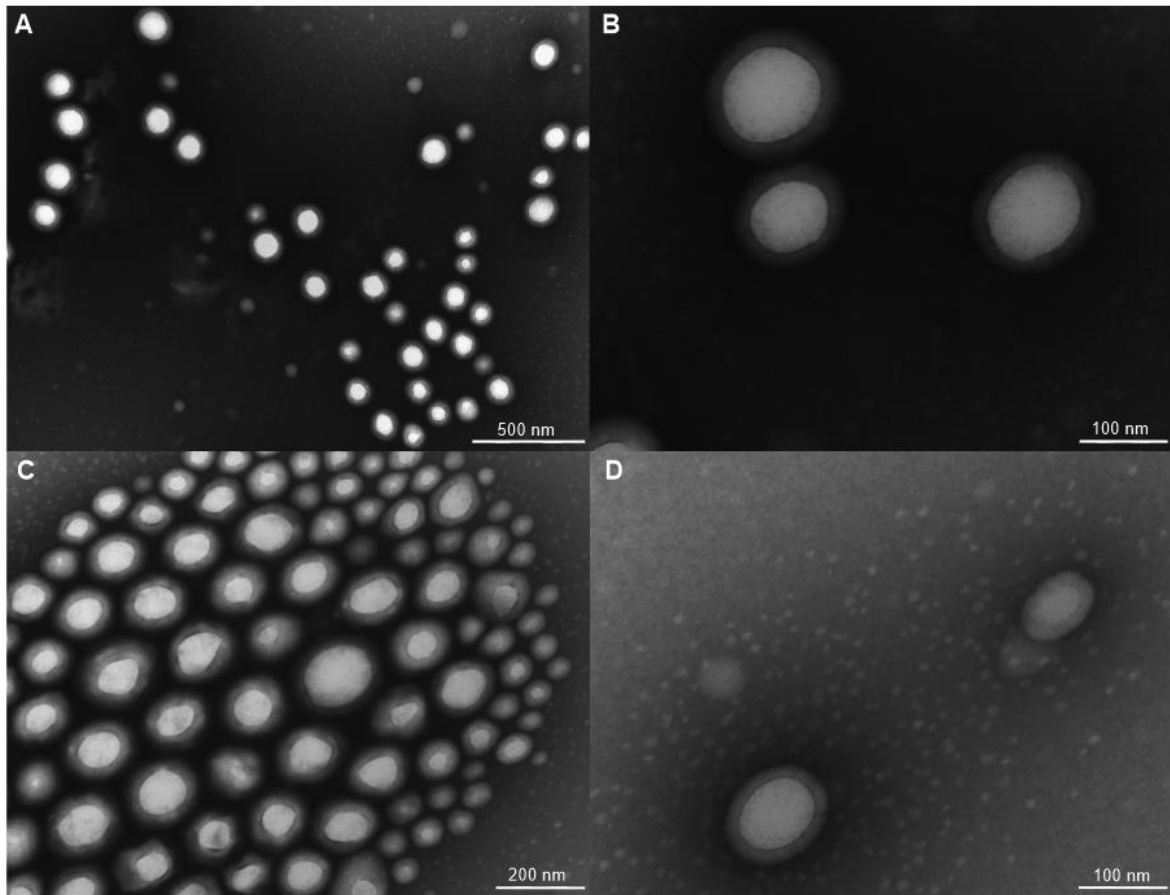
A partir dos dados obtidos, foi possível observar que o encapsulamento dos extratos de própolis nas nanocápsulas não provocou grandes alterações no seu tamanho. A concentração de partículas foi utilizada nos ensaios de citotoxicidade *in vitro*, visto ser essa unidade de grandeza recomendada para esse tipo de experimento para as nanopartículas (KONG et al., 2011).

5.3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Nesse tipo de microscopia, um feixe de elétrons é incidido na amostra e interage com ela de diferentes maneiras; sendo que os elétrons que conseguem atravessá-la chegam às lentes eletromagnéticas do equipamento, permitindo a formação de imagens de alta resolução das nanoestruturas (SENTHIL KUMAR; GRACE PAVITHRA; NAUSHAD, 2019; TOMODA et al., 2020).

A partir da Figura 24, pode-se observar que as NC-PV e NC-PVB eram esféricas, em sua maioria, algumas um pouco alongadas, sendo possível visualizar uma estrutura do tipo *core-shell* com uma camada de revestimento formada pelo polímero e estabilizante polimérico ao redor do núcleo oleoso, que representa uma porção significativa da nanoestrutura. Estruturas esféricas semelhantes às que observamos são relatadas na literatura para nanocápsulas com diferentes polímeros, óleos e estabilizantes (CHANG, 2012; BRUINSMANN et al., 2019; KOLONKO et al., 2020).

Figura 24 – Imagens das nanocápsulas contendo extrato de própolis vermelha brasileira (A e B) e verde (C e D) obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão



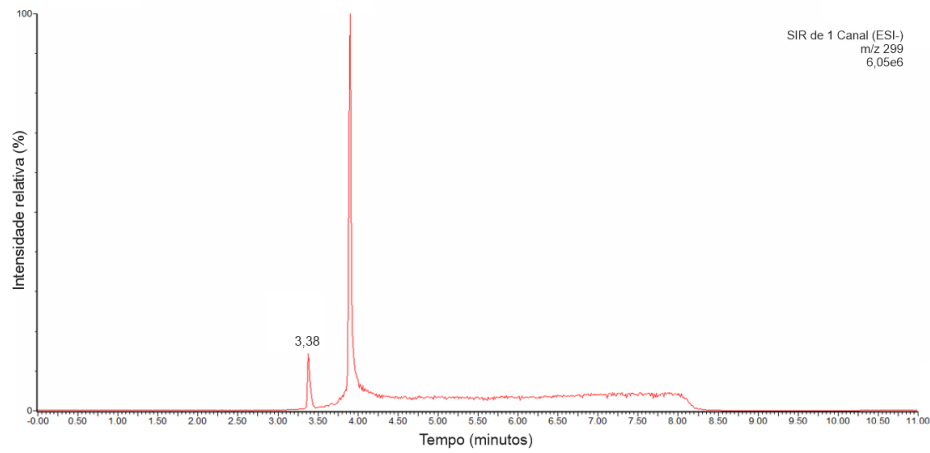
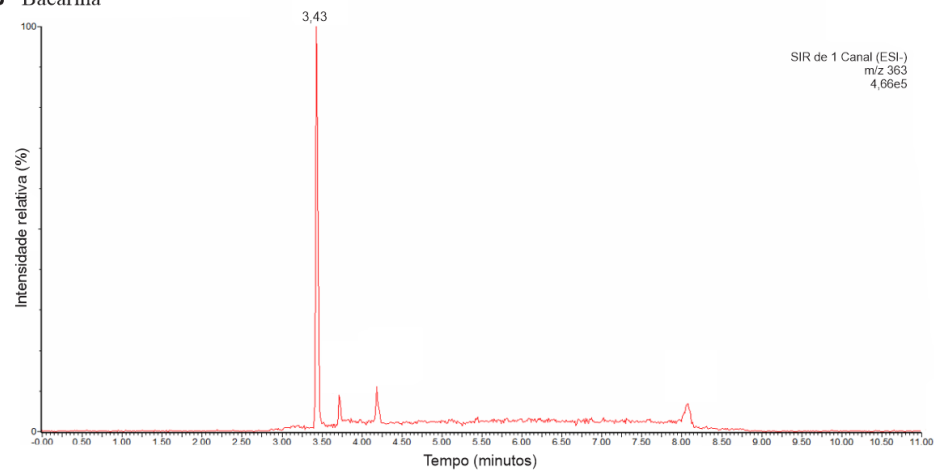
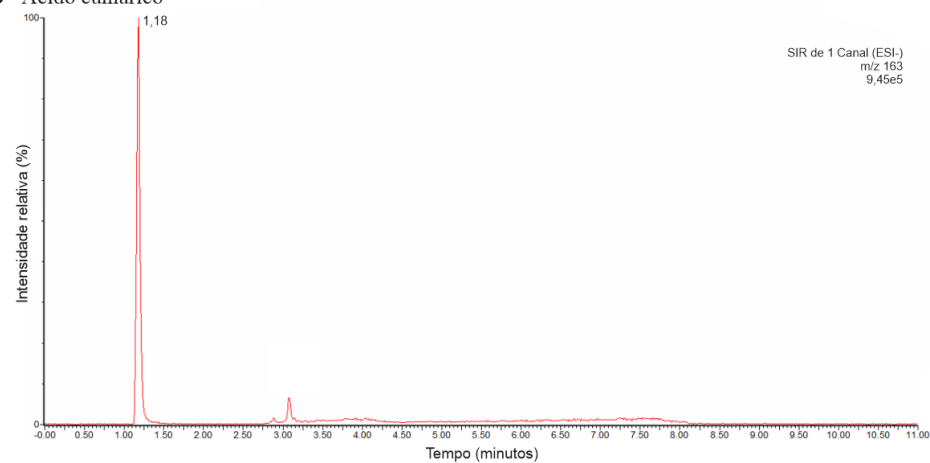
Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir das imagens obtidas, foi possível mensurar o tamanho das NC-PV e NC-PVB: 105 ± 23 e 98 ± 12 nm ($n = 150$), respectivamente. Os diâmetros foram um pouco menores do que os obtidos pelas técnicas de DLS e NTA pois nestas últimas avalia-se o diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas que inclui o diâmetro das partículas mais a camada de estabilização, enquanto na análise por TEM a partir do *software* Image J mede-se apenas o diâmetro das nanopartículas em si.

5.4 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA PV

5.4.1 Composição e vazão da fase móvel

Os cromatogramas obtidos a partir de soluções a 500 ng/mL de cada padrão (artepelin C, bacarina e ácido cumárico) estão ilustrados na Figura 25 (A, B e C).

Figura 25 – Cromatogramas de artepelin C (t_r 3,38) (A), bacarina (t_r 3,43) (B) e ácido cumárico (t_r 1,18) (C)**A** Artepelin C**B** Bacarina**C** Ácido cumárico

Fonte: Elaborado pelo autor.

A combinação do modo de ionização negativo (ESI -) com a adição de 0,1% de acetato de amônio na fase móvel proporcionou um maior sinal de ionização dos compostos em comparação ao aditivo ácido, permitindo a otimização individual das condições de ionização,

conforme Tabela 12. Os três padrões foram monitorados durante a corrida cromatográfica quanto à m/z carga de interesse em modo SIR.

Tabela 12 – Parâmetros do espectrômetro de massas para os padrões artepelin C, bacarina e ácido cumárico

| Padrão | t_r (min) | Massa molar (g/mol) | Razão massa carga (m/z) | Voltagem do cone (V) |
|----------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| Artepelin C | 3,38 | 300,39 ^a | 299 | 45 |
| Bacarina | 3,43 | 364,43 ^b | 363 | 50 |
| Ácido cumárico | 1,18 | 164,16 ^c | 163 | 30 |

Onde: t_r: tempo de retenção. ^aFonte: SciFinder, 2021a; ^bFonte: SciFinder, 2021b; ^cFonte: SciFinder, 2021c.

O valor de pKa de uma substância permite predizer se em determinado pH ela terá seu equilíbrio deslocado para a forma ionizada ou não ionizada (STROPE et al., 2018). Os pKas calculados disponíveis no SciFinder do artepelin C, bacarina e ácido cumárico são, respectivamente, 4,69, 4,39 e 4,65 (SCIFINDER, 2021a; SCIFINDER, 2021b; SCIFINDER, 2021c). O pH da porção aquosa da fase móvel utilizada permaneceu entre 5,75 e 6,11 durante todas as análises. Dessa forma, é possível inferir que no pH da fase móvel os compostos da própolis estão desprotonados e, portanto, na forma adequada para serem analisados pelo modo de detecção utilizado.

Foram testadas composições iniciais de fase móvel com 95, 80, 70 e 50% de solução A e fluxos de 0,35, 0,4 e 0,5 mL/min. Foi observado que quando utilizado inicialmente no gradiente porcentagens maiores da solução A, a eficiência do pico de ácido cumárico era melhorada. O mesmo perfil foi observado quando utilizou 100 % de solução B para os analitos artepelin C e bacarina, sendo obtido, então, o gradiente de eluição indicado na Tabela 13:

Tabela 13 - Gradiente de eluição utilizado na metodologia desenvolvida por UPLC-MS

| Tempo (minutos) | Solução A^a (%) | Solução B^b (%) |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 0 - 1 | 95 | 5 |
| 2 - 4 | 0 | 100 |
| 4 - 6,5* | 0 | 100 |
| 7 - 11** | 95 | 5 |

Onde: ^a Solução A: água com 0,1% (v/v) de acetato de amônio; ^b Solução B: acetonitrila com 0,1% (v/v) de acetato de amônio; * etapa de limpeza da coluna cromatográfica; ** etapa de condicionamento da coluna cromatográfica.

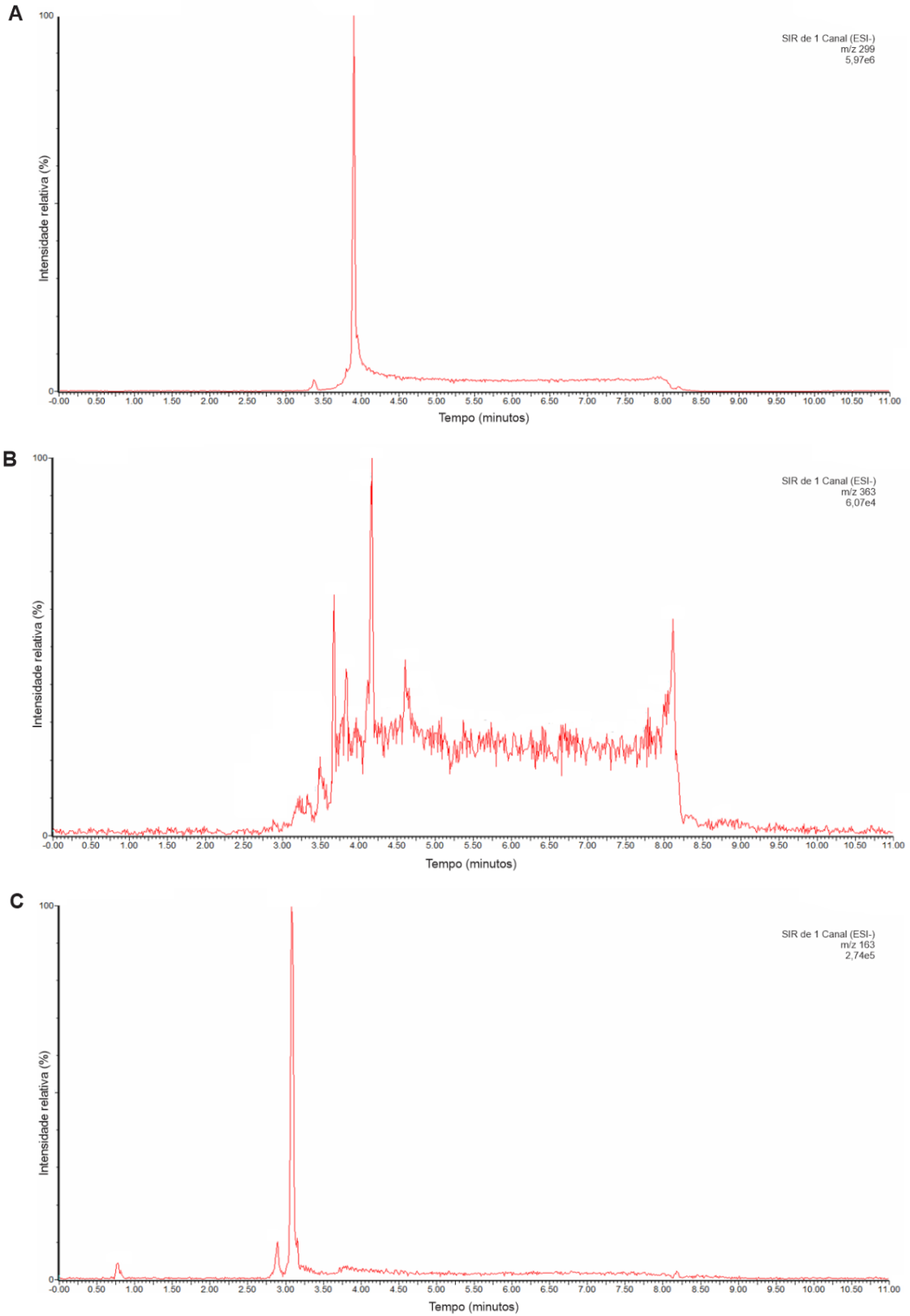
O fluxo de 0,35 mL/min. foi escolhido por proporcionar melhores condições de funcionamento ao equipamento, além de ser suficiente para proporcionar picos com características analíticas adequadas. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 11 minutos e o volume de injeção da amostra foi de 1 µL. As condições otimizadas do detector foram: modo negativo (ESI -), cone em rampa de 30 a 50 V, capilar 2,40 kV, temperatura de dessolvatação do gás nitrogênio (N₂) 200 °C e vazão a 500 L.h⁻¹.

5.4.2 Validação

5.4.2.1 Seletividade

A seletividade consiste na capacidade do método em identificar o analito de interesse na presença de outros componentes da matriz ou amostra (ICH, 1995; BRASIL, 2017). Uma das formas de avaliar esse parâmetro é por meio de testes de identificação: o resultado deve ser positivo para o analito em uma amostra que o contenha, como, por exemplo, um padrão de referência, e negativo para uma amostra que contenha somente possíveis interferentes (ICH, 1996; BRASIL, 2017; MARSON et al., 2020). Avaliando os perfis cromatográficos dos padrões e do filtrado de NC-B para cada SIR (Figuras 25 e 26 A, B e C), não foi observado interferente no mesmo t_r e com mesma m/z.

Figura 26 - Cromatogramas do filtrado de suspensão de nanocápsulas sem própolis em seus respectivos SIR: A - 299 (artepelin C – t_r 3,38); B - 363 (bacarina – t_r 3,43); e C - 163 (ácido cumárico – t_r 1,18)



Fonte: Elaborado pelo autor.

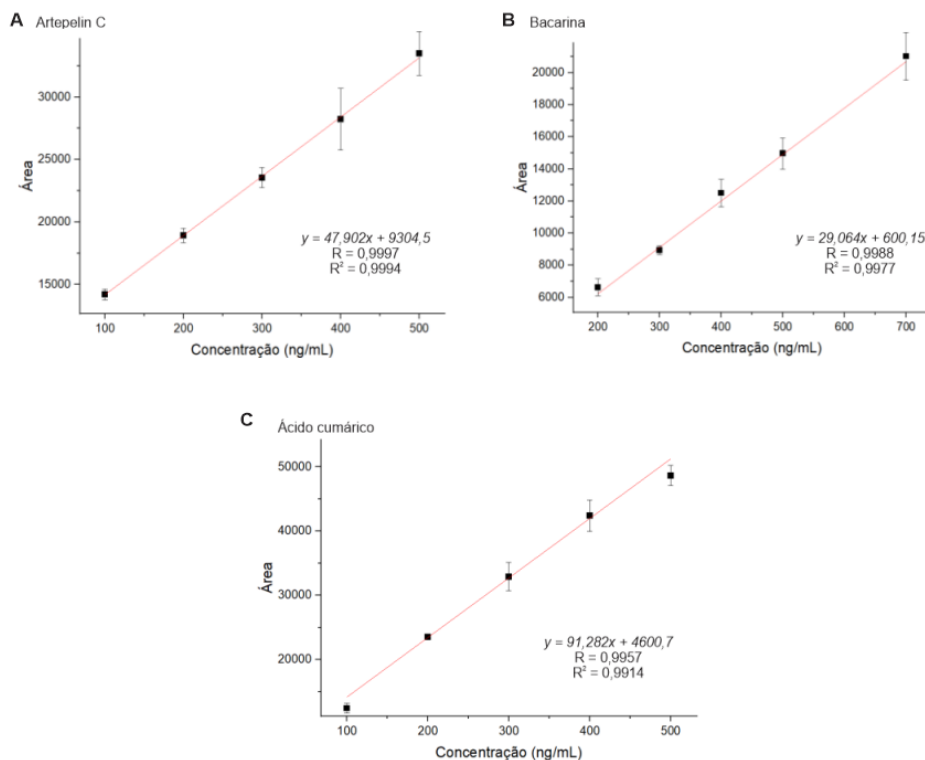
5.4.2.2 Linearidade e faixa de trabalho

Um método é considerado linear quando o sinal obtido pelo detector é proporcional à concentração do analito em um intervalo de diferentes concentrações (BRASIL, 2017; MARSON et al., 2020). De acordo ICH (1996) e a resolução 166/2017 da Anvisa, a curva de calibração obtida deve apresentar, no mínimo, cinco concentrações, avaliadas em triplicata, podendo as soluções serem diluídas a partir de uma solução mãe do padrão (ICH, 1996; BRASIL, 2017).

A faixa de trabalho é estabelecida a partir dos estudos de linearidade compreendendo um intervalo de concentrações no qual se espera que o analito de interesse possa ser quantificado e que, além de linear, deve apresentar precisão e exatidão de resultados (ICH, 1996; BRASIL, 2017; MARSON et al., 2020).

As curvas de calibração obtidas para os marcadores químicos da PV estão representadas graficamente na Figura 27 com a área no eixo das ordenadas e a concentração no eixo das abcissas expressa em ng/mL. A avaliação estatística foi obtida pelo método dos mínimos quadrados. Todas as curvas apresentaram coeficientes de correlação (R) e de determinação (R^2) acima de 0,99, indicando a linearidade do método (BRASIL, 2017).

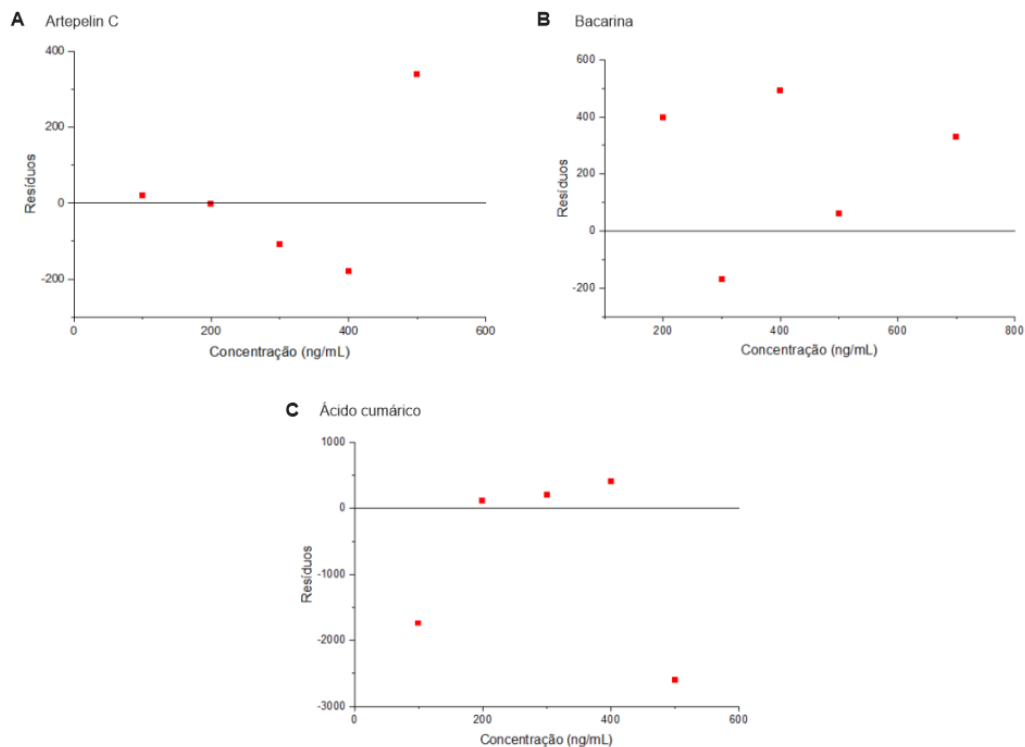
Figura 27 - Curvas de calibração dos padrões artepelin C, bacarina e ácido cumárico



Fonte: Elaborado pelo autor.

A ANVISA na RDC 166/2017 preconiza que também sejam avaliados nesta seção a homocedasticidade e se o coeficiente angular difere significativamente de zero. A homocedasticidade pode ser verificada por meio da análise gráfica e estatística da dispersão dos resíduos, de modo que a avaliação visual da distribuição dos resíduos em torno de zero deve ser aleatória (Figura 28) e o teste estatístico deve indicar que as variâncias são iguais com um nível de significância de 5% ($p > 0,05$) (BRASIL, 2017; MARSON et al., 2020). Os valores de p no teste de Levene foram de 0,828 para o artepelin C, 0,921 para a bacarina e 0,846 para o ácido cumárico e o coeficiente angular dos três padrões foi significativamente diferente de zero. Desta forma, pode-se concluir que o método é linear.

Figura 28 - Gráfico de distribuição de resíduos dos padrões artepelin C (A), bacarina (B) e ácido cumárico (C)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.2.3 Precisão

Em metodologias com fins quantitativos, é importante avaliar a influência dos erros na qualidade dos resultados, podendo esses erros serem sistemáticos, ou seja, causados pelo analista, por variações no instrumento ou no próprio método, ou então aleatórios, quando não se tem controle sobre a sua ocorrência (KRUIVE et al., 2015a; MARSON et al., 2020).

A precisão permite considerar quão próximos são os resultados de várias medidas de uma amostra, sob mesmas condições analíticas (BRASIL, 2017; MARSON et al., 2020). Dentro de um mesmo laboratório, se os resultados forem avaliados a partir de medidas obtidas em um mesmo dia, com soluções preparadas por um único analista e sob as mesmas condições e equipamento, determina-se a repetibilidade ou precisão intra-dia. Já quando ocorrem alterações pertinentes à aplicação do método, como realização das análises em diferentes dias, por analistas distintos ou ainda com outras pequenas modificações, têm-se a precisão intermediária (BRASIL, 2017; ICH, 1996; KRUIVE et al., 2015a; MARSON et al., 2020).

Para a repetibilidade, o critério de aceitação recomendado e comumente utilizado é de até 2% (FDA, 2020; MARSON et al., 2020); já com relação à precisão intermediária, alguns autores citam como referência o limite de 20% para o DPR (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2002; KRUIVE et al., 2015a; RIBANI et al., 2004). Marson e colaboradores sugerem que as médias dos dois tipos de precisão sejam comparadas pelo teste T para atestar a precisão intermediária com maior segurança (MARSON et al., 2020). Os resultados das análises do parâmetro precisão estão descritos na Tabela 14, sendo o método em questão considerado preciso pois os dados de repetibilidade foram inferiores a 2% e as médias dos dois tipos de precisão em questão não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$).

Tabela 14 - Repetibilidade e precisão intermediária calculadas em termos de Coeficiente de Variação (CV) e análise estatística por teste de T para os padrões artepelin C, bacarina e ácido cumárico

| Padrão | Concentração (ng/mL) | Repetibilidade | | Precisão intermediária | | p^* |
|-------------------|-------------------------|----------------|--------|---------------------------|--------|--------|
| | | Média | CV (%) | Média | CV (%) | |
| | | (ng/mL) | | (ng/mL) | | |
| Artepelin C | 200 | 201,12 | 1,80 | 199,52 | 3,92 | 0,6413 |
| | 300 | 298,38 | 1,85 | 293,78 | 1,46 | 0,1068 |
| | 400 | 399,34 | 0,66 | 400,11 | 1,27 | 0,8376 |
| Bacarina | 300 | 298,56 | 2,00 | 298,56 | 2,31 | 0,7648 |
| | 400 | 395,44 | 1,83 | 399,57 | 2,66 | 0,3174 |
| | 500 | 494,46 | 0,77 | 493,49 | 0,52 | 0,8275 |
| Ácido cumárico | 200 | 198,74 | 1,59 | 196,87 | 2,84 | 0,9995 |
| | 300 | 297,53 | 1,05 | 293,37 | 1,59 | 0,6073 |
| | 400 | 397,43 | 0,78 | 396,74 | 1,13 | 0,7324 |

Onde: p^* : obtido a partir de teste T.

5.4.2.4 Exatidão

Um método analítico pode ser considerado exato quando os resultados obtidos experimentalmente são próximos ao valor esperado ou tido como verdadeiro para o analito de interesse (BRASIL, 2017; KRUYE et al., 2015a; MARSON et al., 2020). O critério de aceitação para este parâmetro, assim como para a precisão, depende da sua aplicação pretendida e variabilidade intrínseca (BRASIL, 2017; MARSON et al., 2020), porém o FDA recomenda que se utilize a faixa de 97 a 103% (FDA, 2020). Como os valores para todos os marcadores químicos avaliados ficaram dentro da faixa recomendada (Tabela 15), o método foi considerado exato.

Tabela 15 - Exatidão calculada para os padrões artepelin C, bacarina e ácido cumárico

| Padrão | Concentração teórica (ng/mL) | Concentração média experimental (ng/mL) | Exatidão (%) | DPR |
|----------------|-------------------------------------|--|---------------------|------------|
| Artepelin C | 200 | 201,12 | 100,56 | 1,80 |
| | 300 | 298,38 | 99,46 | 1,85 |
| | 400 | 399,34 | 99,84 | 0,66 |
| Bacarina | 300 | 298,56 | 99,52 | 2,00 |
| | 400 | 395,44 | 98,86 | 1,83 |
| | 500 | 494,46 | 98,89 | 0,77 |
| Ácido cumárico | 200 | 198,74 | 99,37 | 1,59 |
| | 300 | 297,53 | 99,18 | 1,05 |
| | 400 | 397,43 | 99,36 | 0,78 |

Onde: DPR: desvio padrão relativo.

5.4.2.5 Limites de detecção e quantificação

A menor quantidade de analito que pode ser detectada com segurança pelo método define o limite de detecção; já a concentração mais reduzida que pode ser determinada e que apresente precisão e exatidão corresponde ao limite de quantificação (BRASIL, 2017; MARSON et al., 2020).

O valor de IC foi obtido por meio da equação da reta da média das curvas de calibração utilizadas para o cálculo do parâmetro linearidade. O desvio padrão foi calculado a partir do

coeficiente linear ou intercepto com o eixo y das mesmas curvas citadas anteriormente. Os valores calculados de ambos os limites estão indicados na Tabela 16.

Tabela 16 - Limites de detecção e quantificação para artepelin C, bacarina e ácido cumárico

| Padrão | Limite de detecção (ng/mL) | Limite de quantificação (ng/mL) |
|----------------|-----------------------------------|--|
| Artepelin C | 2,7 | 8,2 |
| Bacarina | 58,4 | 176,9 |
| Ácido cumárico | 2,5 | 7,6 |

5.4.2.6 Robustez

O parâmetro robustez permite demonstrar se pequenas variações na metodologia são capazes de promover alterações importantes nas respostas analíticas (BRASIL, 2017; KRUIVE et al., 2015b; MARSON et al., 2020). A ANVISA, o ICH e diversos autores recomendam avaliar o impacto de modificações como a vazão da fase móvel, sua composição e pH, diferentes temperaturas, entre outros, cabendo ao analista decidir quais parâmetros deseja avaliar (BRASIL, 2017; ICH, 1996; MARSON et al., 2020).

As variações propostas para os diferentes parâmetros podem ser analisadas de forma individual, o que demandaria um grande número de experimentos e disponibilidade de tempo e recursos, ou por meio de um planejamento experimental, reduzindo ativamente a quantidade de ensaios pela possibilidade de alteração de diversas condições ao mesmo tempo (MARSON et al., 2020).

A robustez foi avaliada estatisticamente por teste T pela comparação dos resultados das variações em triplicata com a condição metodológica padronizada (MARSON et al., 2020), sendo o valor de p utilizado para determinar se houve diferença estatística entre as médias das áreas e dos t_r dos padrões entre o método desenvolvido e cada um dos oito experimentos propostos com as variações (Tabelas 17, 18 e 19), e também pela análise dos gráficos de efeitos gerados a partir do planejamento fatorial geral (Figura 29).

Tabela 17 - Parâmetros avaliados na robustez do método para artepelin C

| Experimento | Área | Valor de p^a para Área | t_r | Valor de p^a para t_r |
|---------------------|-------------|--|-------------------------|--|
| Método desenvolvido | 22533,86 | N/A | 3,35 | N/A |
| 1 | 18840,75 | 0,0284* | 3,28 | 0,0142* |
| 2 | 13512,64 | 0,0006*** | 3,27 | 0,0130* |
| 3 | 19418,28 | 0,0020* | 3,25 | 0,0012** |
| 4 | 20537,72 | 0,0205* | 3,45 | N/A |
| 5 | 12680,26 | 0,0197* | 3,49 | 0,0051** |
| 6 | 17308,93 | 0,0175* | 3,47 | 0,0007*** |
| 7 | 13904,66 | 0,0045** | 3,30 | 0,0051** |
| 8 | 10961,01 | < 0,0001*** | 3,52 | 0,0004*** |

Onde: ^avalores de p obtidos por teste T; t_r = tempo de retenção; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; N/A: não se aplica.

Tabela 18 - Parâmetros avaliados na robustez do método para bacarina

| Experimento | Área | Valor de p^a para Área | t_r | Valor de p^a para t_r |
|---------------------|-------------|--|-------------------------|--|
| Método desenvolvido | 5015,72 | N/A | 3,38 | N/A |
| 1 | 4557,06 | 0,1512 | 3,32 | 0,0188* |
| 2 | 4738,03 | 0,2624 | 3,31 | 0,0171* |
| 3 | 4823,67 | 0,5221 | 3,29 | 0,0015** |
| 4 | 4977,15 | 0,8719 | 3,50 | N/A |
| 5 | 5364,37 | 0,3465 | 3,53 | 0,0019** |
| 6 | 5609,28 | 0,1127 | 3,53 | 0,0005*** |
| 7 | 5275,51 | 0,5275 | 3,35 | 0,0099** |
| 8 | 5668,51 | 0,1041 | 3,57 | 0,0003*** |

Onde: ^avalores de p obtidos por teste T; t_r = tempo de retenção; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; N/A: não se aplica.

Tabela 19 - Parâmetros avaliados na robustez do método para ácido cumárico

| Experimento | Área | Valor de p^a para Área | t_r | Valor de p^a para t_r |
|---------------------|----------|--------------------------|-------|---------------------------|
| Método desenvolvido | 18718,79 | N/A | 1,02 | N/A |
| 1 | 19043,74 | 0,4364 | 1,03 | 0,2254 |
| 2 | 17468,94 | 0,1647 | 1,00 | 0,6326 |
| 3 | 16692,68 | 0,0115* | 0,94 | 0,0202* |
| 4 | 16956,06 | 0,0079** | 1,02 | N/A |
| 5 | 18055,16 | 0,2195 | 1,12 | 0,0407* |
| 6 | 16723,73 | 0,0014** | 1,06 | N/A |
| 7 | 16890,55 | 0,0205* | 1,04 | 0,0377* |
| 8 | 17808,93 | 0,0363* | 1,21 | 0,0003*** |

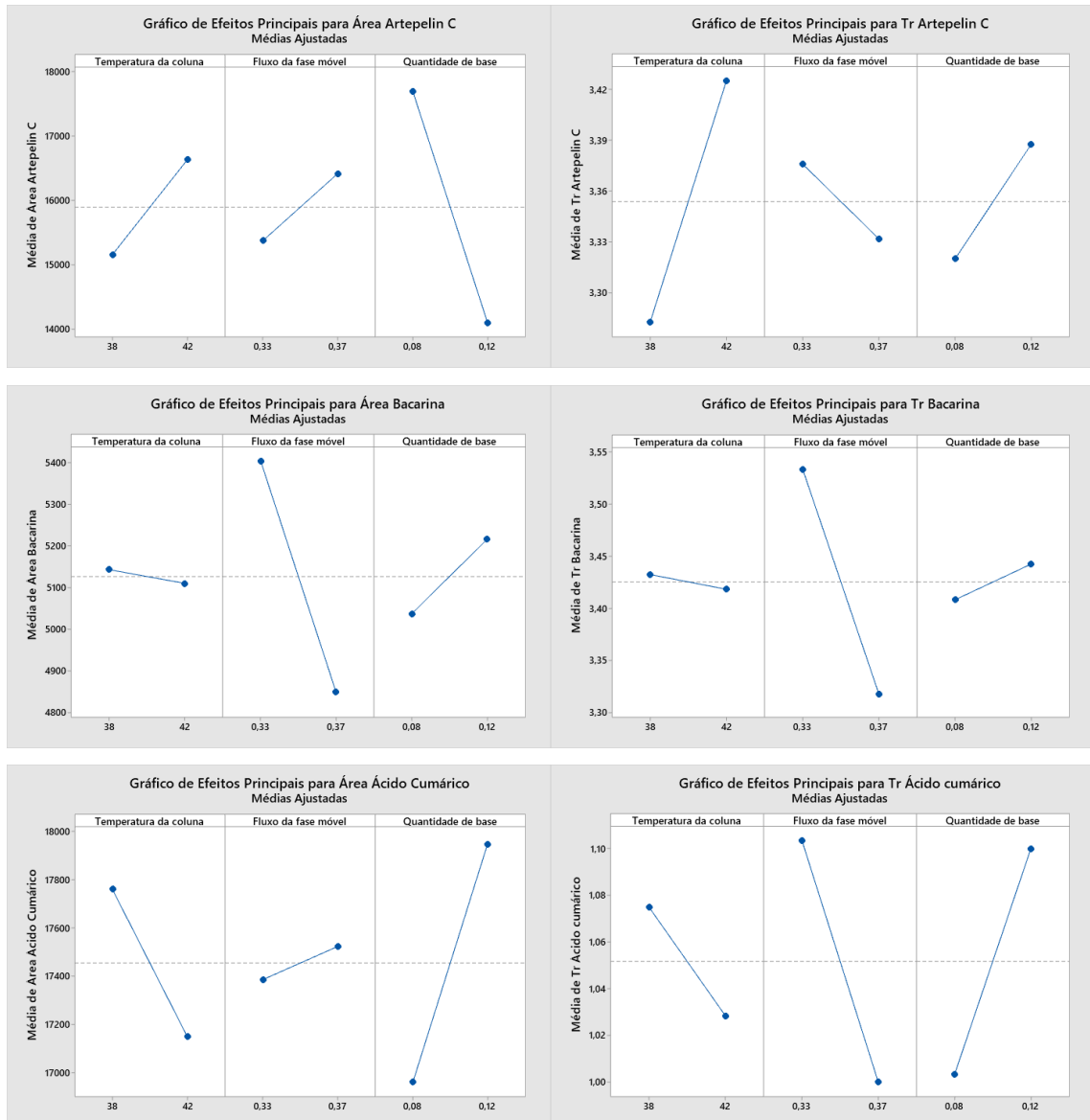
Onde: ^avalores de p obtidos por teste T; t_r = tempo de retenção; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; N/A: não se aplica.

Não foi possível aplicar o teste T nas comparações de t_r aplicadas ao experimento 4 para todos os padrões e 6 para ácido cumárico pois os valores das replicatas foram iguais. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o método desenvolvido e as variações propostas nos parâmetros área e t_r para o artepelin C e somente t_r para bacarina. Com relação ao ácido cumárico, não houve nenhuma diferença estatística em relação ao método desenvolvido apenas para os experimentos 1 e 2.

É possível observar na Figura 29 como as variações de temperatura da coluna, vazão de fase móvel e quantidade de aditivo na fase móvel influenciam nas respostas de área e t_r para cada padrão. Pela amplitude das linhas mostradas nos gráficos, pode-se verificar que apenas pequenas variações na temperatura da coluna não trazem um impacto relevante nos valores dos parâmetros de área e t_r quando o padrão é a bacarina, assim como breves oscilações no fluxo da fase móvel também não alteram tanto os valores de área do padrão ácido cumárico.

A partir das observações citadas, é importante salientar que pequenas variações nos parâmetros avaliados (temperatura da coluna, vazão/ fluxo da fase móvel e quantidade de acetato de amônio) podem comprometer a qualidade dos resultados obtidos pela metodologia em questão, devendo os mesmos serem controlados durante as análises.

Figura 29 - Gráfico de Efeitos Principais das médias das áreas e tempos de retenção (t_r) para artepelin C, bacarina e ácido cumárico avaliados na robustez do método analítico



5.4.3 Avaliação do extrato de PV e da eficiência de encapsulamento

O extrato de PV analisado por UPLC-MS apresentou 92,75 $\mu\text{g/mL}$ de artepelin C (9,27 %), 32,07 $\mu\text{g/mL}$ de bacarina (3,21 %) e 2,08 $\mu\text{g/mL}$ de ácido cumárico (0,21%). Sousa e colaboradores determinaram os mesmos componentes em questão em amostras de PV dos estados de São Paulo e Minas Gerais coletadas entre os anos de 2001 e 2002 (SOUSA et al., 2007). Eles quantificaram, em média, de 5 a 9% de artepelin C, de 7 a 10% de bacarina, e de 0,5 a 1,5% de ácido cumárico e cafeico (SOUSA et al., 2007). Extratos hidroalcoólicos de PV analisados por HPLC/DAD pelo grupo de Rodrigues et al. entre 2015 e 2016, mostraram de

4,57 a 5,04% de artepelin C, cerca de 2% de bacarina e de 1,03 a 1,43% de ácido cumárico (RODRIGUES et al., 2020).

Como é possível observar, a composição da própolis pode apresentar variações no seu perfil fitoquímico dentre amostras coletadas em uma mesma região, porém em diferentes períodos. Entretanto, analisando os resultados da literatura, pode-se inferir que, em geral, os extratos de PV apresentam maiores quantidades de artepelin C, seguido pela bacarina e ácido cumárico, similarmente ao encontrado no extrato de PV utilizado nesse projeto.

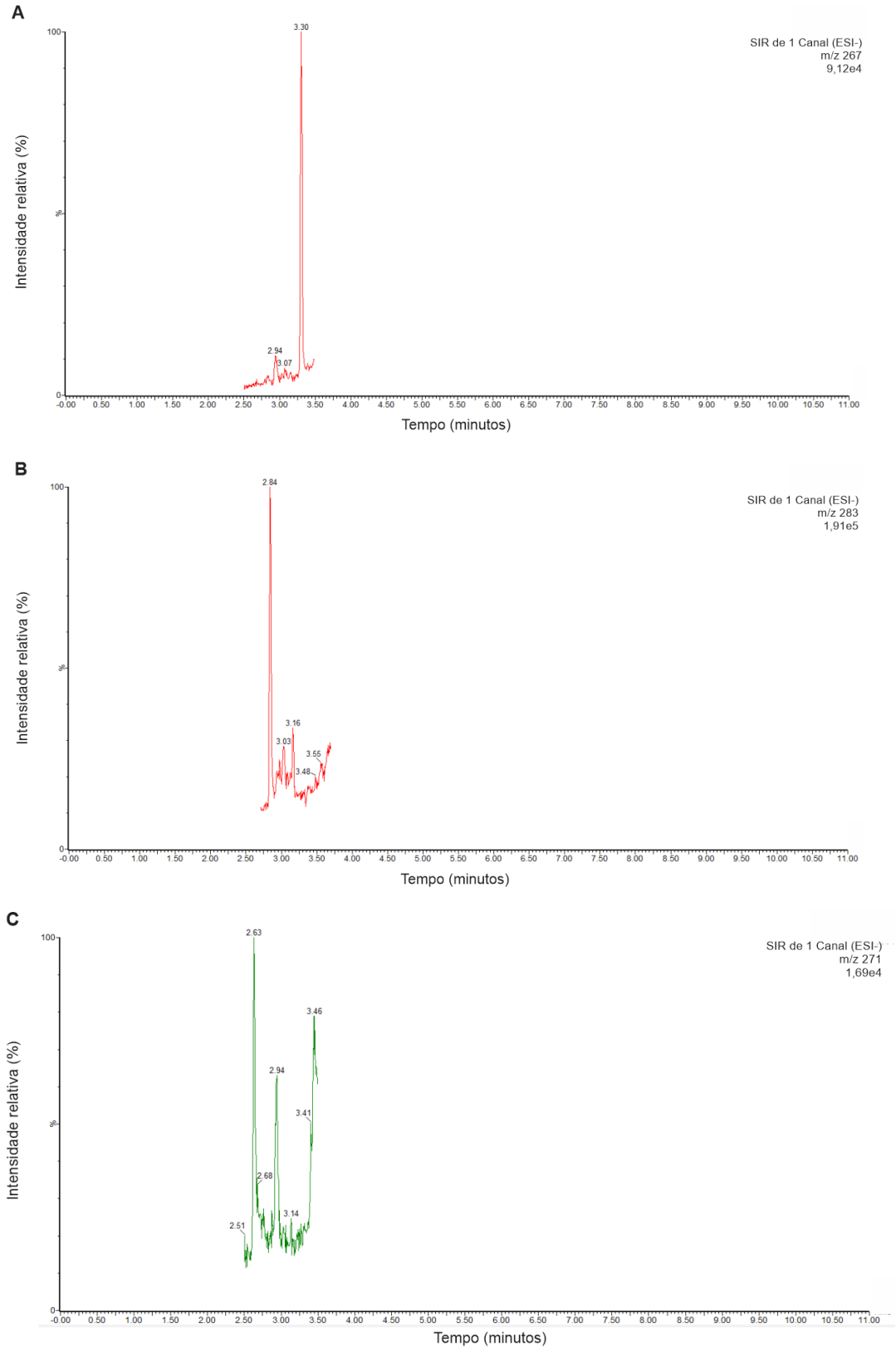
A eficiência de encapsulamento determinada pelo método de UPLC-MS validado foi maior do que 99,95% e 99,69% para artepelin C e bacarina, respectivamente, e de 43,07 % \pm 3,90 para o ácido cumárico. Quanto mais hidrofóbicas forem essas substâncias, mais alto será o seu log P e maior tende a ser a sua encapsulação e estabilidade dentro das nanocápsulas desenvolvidas (SU et al., 2018; TAO; CHOW; ZHENG, 2019). Os logs P calculados do artepelin C, bacarina e ácido cumárico são, respectivamente, 4,67, 4,33 e 1,00 (SCIFINDER, 2021a; SCIFINDER, 2021b; SCIFINDER, 2021c). O fato do ácido cumárico ser mais hidrofílico, com um menor log P, pode ser uma das razões para que a sua encapsulação não tenha sido tão eficiente, pois este composto teria mais afinidade pelo meio aquoso, externo às nanocápsulas (TAO; CHOW; ZHENG, 2019).

5.5 MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO DA PVB POR UPLC-MS

5.5.1 Seletividade do método

Os perfis cromatográficos do filtrado de NC-B para cada SIR (Figura 30) demonstraram que o método utilizado é seletivo pois não foram observados interferentes no mesmo t_r e com mesma m/z que os padrões formononetina, biochanina A e vestitol.

Figura 30 - Cromatogramas do filtrado de suspensão de nanocápsulas sem própolis em seus respectivos SIR: 267 (formononetina – t_r 2,98) (A); 283 (biochanina A – t_r 3,26) (B); e 271 (vestitol – t_r 2,97) (C)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5.2 Avaliação do extrato de PVB e Eficiência de encapsulamento

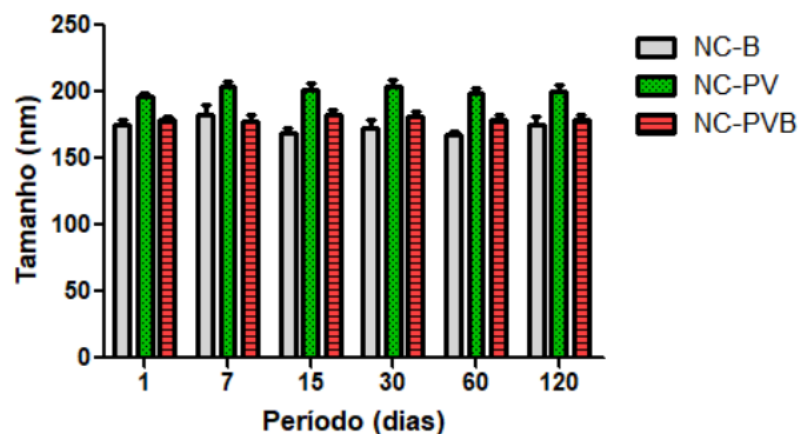
O extrato de PVB analisado por UPLC-MS apresentou 65,80 $\mu\text{g/mL}$ de formononetina (6,58 %), 0,98 $\mu\text{g/mL}$ de biochanina A (0,10 %) e 43,40 $\mu\text{g/mL}$ de vestitol (4,34 %). Rufato et al. analisaram um extrato de PVB proveniente do Estado de Alagoas, cuja própolis foi coletada no ano de 2013, e também obtiveram uma maior quantidade de formononetina (34,05 $\mu\text{g/mL}$) em relação à biochanina A (3,15 $\mu\text{g/mL}$) (RUFATTO et al., 2018).

A eficiência de encapsulamento dos marcadores da PVB foram: formononetina - 98,91 % \pm 0,64; biochanina A - 99,91 % \pm 0,14; e vestitol - 97,84 % \pm 0,14. A formononetina, biochanina A e vestitol apresentam log P calculado de 2,86, 3,34 e 3,26, respectivamente (SCIFINDER, 2021d; SCIFINDER, 2021e; SCIFINDER, 2021f), indicando serem lipofílicos e, portanto, com afinidade pelo núcleo oleoso. Conforme citado no item 5.4.3, isso pode justificar a alta eficiência de encapsulamento dos três marcadores.

5.6 ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

As Figuras 31 a 36 mostram as variações de tamanho, PDI e potencial zeta das NC-B, NC-PV e NC-PVB obtidas por DLS, pH e eficiência de encapsulamento ao longo de 120 dias.

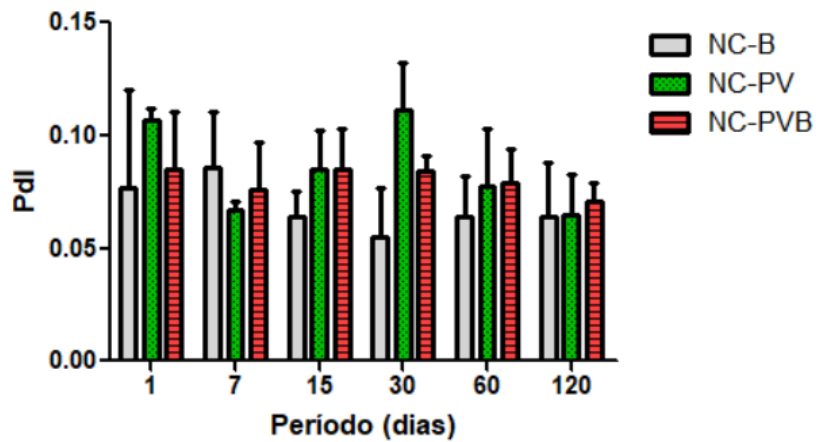
Figura 31 – Diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas sem própolis (NC-B) e contendo extratos de própolis verde (NC-PV) e vermelha brasileira (NC-PVB) em função do tempo



Onde: NC-B: nanocápsulas sem própolis; NC-PV: nanocápsulas contendo extrato de própolis verde; NC-PVB: nanocápsulas contendo extrato de própolis vermelha brasileira.

Fonte: Elaborado pelo autor.

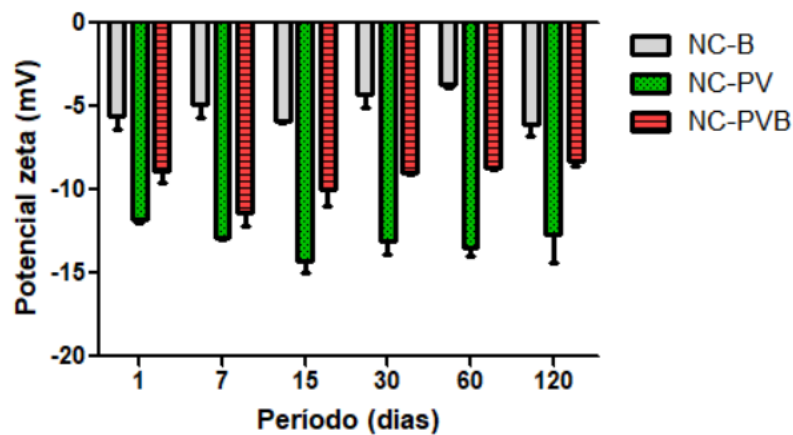
Figura 32 –Índice de polidispersão (PdI) obtidos nas análises das nanopartículas sem própolis (NC-B) e contendo extratos de própolis verde (NC-PV) e vermelha brasileira (NC-PVB) em função do tempo



Onde: PdI: índice de polidispersão; NC-B: nanocápsulas sem própolis; NC-PV: nanocápsulas contendo extrato de própolis verde; NC-PVB: nanocápsulas contendo extrato de própolis vermelha brasileira.

Fonte: Elaborado pelo autor.

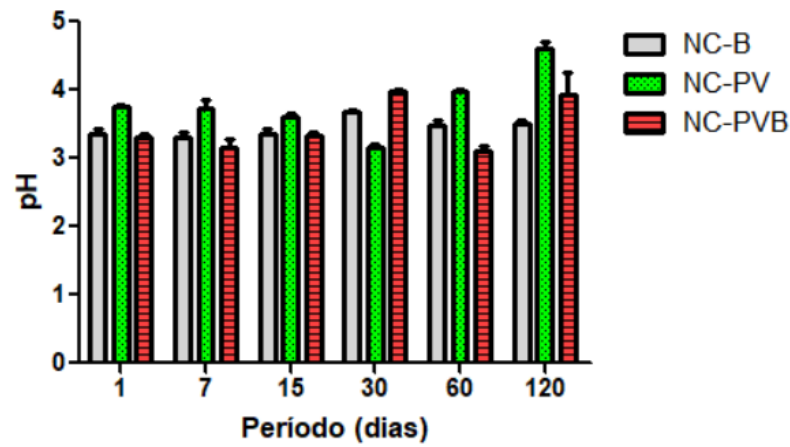
Figura 33 –Potencial zeta (mV) das nanopartículas sem própolis (NC-B) e contendo extratos de própolis verde (NC-PV) e vermelha brasileira (NC-PVB) em função do tempo



Onde: NC-B: nanocápsulas sem própolis; NC-PV: nanocápsulas contendo extrato de própolis verde; NC-PVB: nanocápsulas contendo extrato de própolis vermelha brasileira.

Fonte: Elaborado pelo autor.

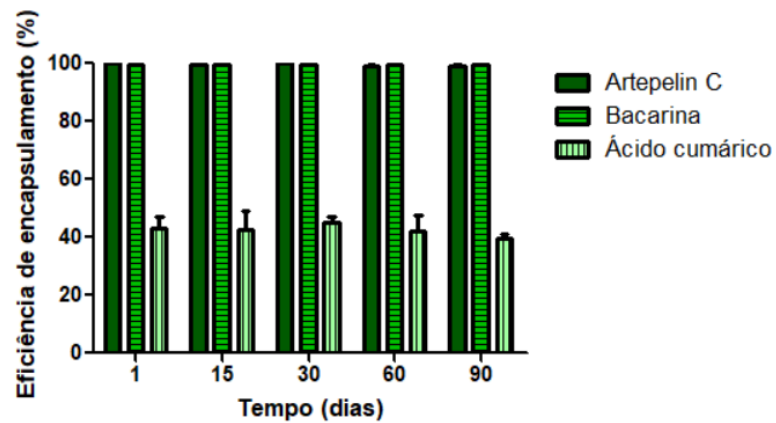
Figura 34 – pH das formulações de nanopartículas sem própolis (NC-B) e contendo extratos de própolis verde (NC-PV) e vermelha brasileira (NC-PVB) em função do tempo



Onde: NC-B: nanocápsulas sem própolis; NC-PV: nanocápsulas contendo extrato de própolis verde; NC-PVB: nanocápsulas contendo extrato de própolis vermelha brasileira.

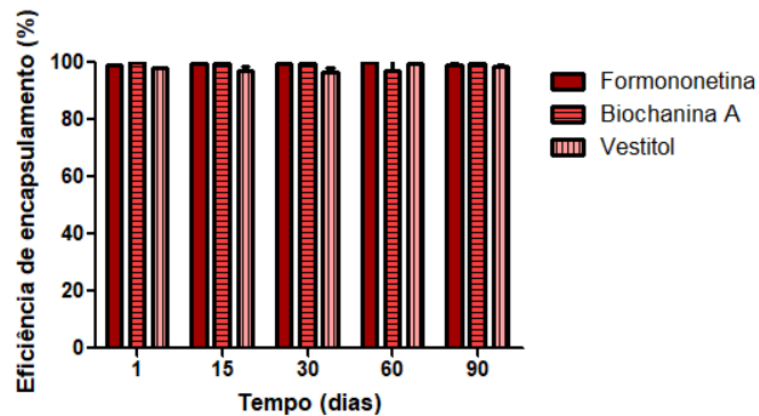
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 35 - Eficiência de encapsulamento do extrato de própolis verde



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 36 - Eficiência de encapsulamento do extrato de própolis vermelha Brasileira



Fonte: Elaborado pelo autor.

A comparação estatística por ANOVA com pós teste de Tukey do tamanho das nanopartículas dentro de um mesmo grupo (NC-B, NC-PV ou NC-PVB) indicou que não houve diferença estatística ao longo do tempo para nenhuma das formulações ($p = 0,4508$, $0,8089$ e $0,8929$, respectivamente) indicando a alta estabilidade das nanoestruturas desenvolvidas. Os valores de PDI se mantiveram inferiores a $0,11$, indicando que as formulações permaneceram com baixa polidispersão durante todo o período avaliado.

Apesar de o potencial zeta não ser um indicativo essencial da estabilidade das nanopartículas desenvolvidas pelo fato de elas também serem estabilizadas estericamente, o fato de ele se manter negativo ao longo do tempo pode indicar a integridade do PLA na formulação, além da presença de um impedimento da aglomeração das nanoestruturas pela repulsão das cargas semelhantes que se formam na superfície das partículas.

A hidrólise é um dos principais mecanismos de degradação do polímero PLA: a água presente no meio induz a quebra das ligações éster presentes no polímero, liberando assim monômeros ácidos que, conseqüentemente, reduzem o valor do pH da solução/suspensão (ELSAWY et al., 2017; ZAABA; JAAFAR, 2020). Sendo assim, alterações significativas no pH podem indicar uma degradação do polímero PLA, porém ela tende a ser menos pronunciada em valores de pH em torno de 4 a 4,5 (ELSAWY et al., 2017; ŁYSIK et al., 2019). Além disso, Łysic e colaboradores, ao avaliarem a degradação do PLA em tampão fosfato salino (PBS) nas temperaturas de 37 e 42 °C e pH 2 ou 7,4 com base em intumescimento e perda de peso molecular, observaram que temperaturas mais elevadas influenciam mais na acentuação do intumescimento e da perda de massa do polímero do que o pH, além de sugerirem que o revestimento da superfície das nanopartículas pode retardar os mecanismos de degradação do polímero (ŁYSIK et al., 2019). Dessa forma, o uso do Kolliphor® P407 como agente estabilizante e o armazenamento das formulações em temperatura reduzida (4°C) podem ter contribuído para a estabilidade das nanopartículas.

Diante dos resultados expostos, as formulações foram consideradas estáveis em um período de 120 dias quando armazenadas a 4 °C. Além disso, a eficiência de encapsulamento dos marcadores dos dois extratos se manteve estável por todo o período avaliado (90 dias).

5.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

5.7.1 Determinação da condição *sink* e seletividade dos métodos

A condição *sink* é aquela no qual a quantidade de fármaco presente no meio receptor deve ser inferior a 20% da sua solubilidade ou capacidade de saturação no referido solvente (SIEPMANN; SIEPMANN, 2020). É importante manter esse estado durante todo o experimento para evitar que a liberação seja interrompida devido à saturação do meio de dissolução.

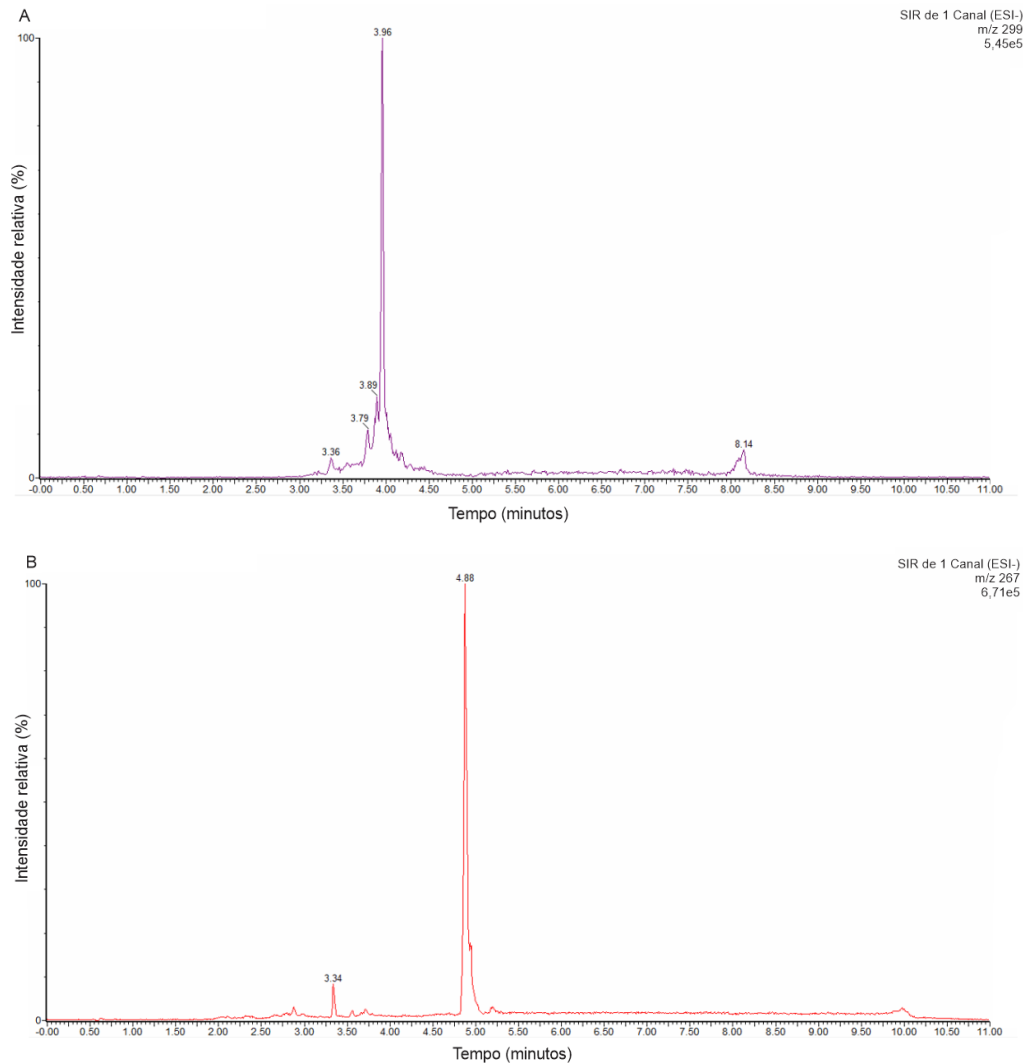
Sendo assim, decorridos 24 h da adição de um excesso dos extratos de própolis aos meios receptores propostos (tampão fosfato 0,03M com ou sem adição de Tween[®] 80) foram realizadas as quantificações dos marcadores artepelin C e formononetina com o objetivo de definir qual seria o meio de dissolução mais adequado ao experimento de liberação, bem como o volume dessa solução que garantisse a condição *sink* dos analitos. A partir dos dados apresentados na Tabela 20, é possível observar que a adição de tensoativo ao meio receptor auxilia na quantificação dos analitos em questão no método desenvolvido. O experimento foi então conduzido com meio receptor tampão fosfato 0,03M pH 7,4 com adição de 0,5% e 0,2% de Tween[®] 80 para a condução do experimento de perfil de liberação dos marcadores artepelin C e formononetina, respectivamente, sendo o volume desse meio calculado de forma a garantir a condição *sink* do experimento, não excedendo 10% da concentração dos analitos.

Tabela 20 - Concentração dos analitos artepelin C e formononetina obtidas por UPLC-MS nos diferentes meios de dissolução

| Analito | Meio de dissolução | Concentração (µg/mL) |
|----------------|---|-----------------------------|
| Artepelin C | Tampão fosfato pH 7,4 | 156,7 |
| | Tampão fosfato pH 7,4 + 0,5% de Tween [®] 80 | 466,5 |
| Formononetina | Tampão fosfato pH 7,4 | 1,7 |
| | Tampão fosfato pH 7,4 + 0,2% de Tween [®] 80 | 101,8 |

Avaliando os perfis cromatográficos dos meios de dissolução solução tampão fosfato 0,03M pH 7,4 com adição de 0,2 ou 0,5% de Tween[®]80, mostrados na Figura 37, não foi observado interferente no mesmo t_r e com mesma m/z que formononetina e artepelin C, respectivamente, sendo ambos os métodos considerados seletivos.

Figura 37 – Cromatogramas de solução tampão fosfato 0,03M pH 7,4 com 0,5% de Tween®80 em SIR 299 (artepelin C – t_r 3,38) e com 0,2% de Tween®80 em SIR 267 (formononetina – t_r 2,99)



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7.2 Perfil de liberação de artepelin C e formononetina

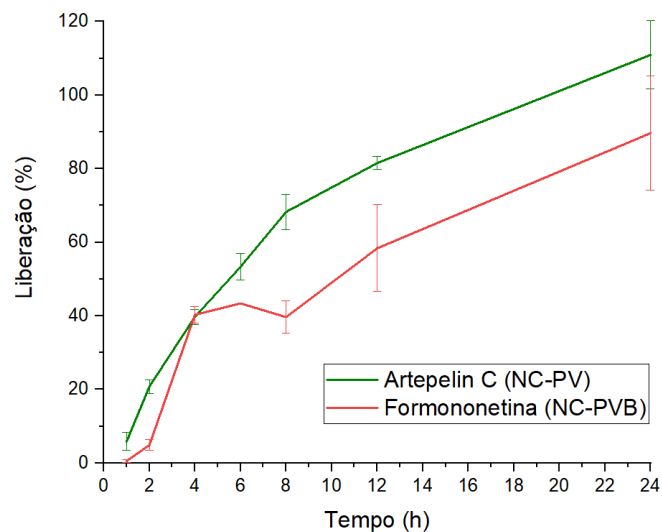
A avaliação do perfil de liberação de fármacos a partir de nanoestruturas norteia o desenvolvimento de sistemas mais adequados à terapêutica, uma vez que o ativo deve se emancipar da nanopartícula em velocidade lenta o bastante para que ela chegue ao tecido alvo e ocorra a redução dos efeitos colaterais em comparação com mecanismos convencionais de administração de medicamentos (MODI; ANDERSON, 2013).

Com relação às nanocápsulas, especificamente, a rigidez da membrana polimérica e a afinidade do fármaco pelo núcleo oleoso são fatores determinantes para a difusão do fármaco para o meio externo (PIRES, 2013). O peso molecular, a cristalinidade e a T_g do polímero tem

papel fundamental na liberação do fármaco a partir da nanoestrutura pois estruturas mais amorfas, elásticas e compostas por polímeros de baixo peso molecular são mais susceptíveis à entrada de água e formação de poros na membrana ou matriz polimérica (KAMALY et al., 2016). O PLA constituído pelos isômeros D e L pode apresentar tanto regiões amorfas quanto cristalinas, uma vez que esses isômeros possuem características diferentes, sendo geralmente hidrofóbico, o que reduz a entrada de água na sua estrutura e, conseqüentemente, a sua hidrólise e degradação (KAMALY et al., 2016).

O mecanismo de liberação de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas envolve geralmente três etapas: *burst*, que corresponde ao fármaco que estava adsorvido à superfície da nanoestrutura; difusão pela membrana ou matriz polimérica, estágio este dependente da degradação do polímero e comumente lento; e erosão rápida da nanoestrutura (LU et al., 2011; KAMALY et al., 2016). A Figura 38 mostra que aproximadamente 100 % de artepelin C e 89% de formononetina foram liberados a partir das nanocápsulas em 24 h.

Figura 38 – Perfil de liberação de artepelin C (NC-PV) e formononetina (NC-PVB) a partir de nanocápsulas contendo extratos de própolis verde ou vermelha brasileira



Onde: NC-PV: nanocápsula contendo extrato de própolis verde; NC-PVB: nanocápsula contendo extrato de própolis vermelha brasileira.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Diferentes modelos matemáticos foram avaliados a fim de identificar o mecanismo pelo qual o fármaco poderia estar sendo liberado das nanoestruturas. Os modelos que apresentaram os maiores R^2 foram os de Higuchi e o de Hixson-Crowell para ambos os analitos, conforme dados da Tabela 21:

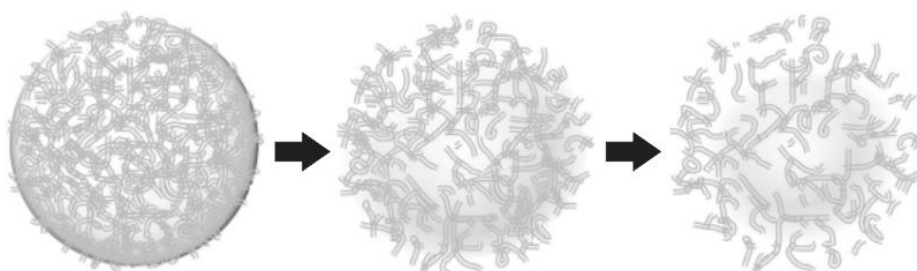
Tabela 21 – Valores de R^2 obtidos a partir da análise dos perfis de liberação de artepelin C e formononetina por diferentes modelos matemáticos

| Analito | R^2 por modelo matemático | | | | |
|---------------|-----------------------------|----------------|------------------|---------|----------------|
| | Ordem zero | Primeira ordem | Korsmeyer-Peppas | Higuchi | Hixson-Crowell |
| Artepelin C | 0,8847 | 0,5695 | 0,9235 | 0,9815 | 0,9566 |
| Formononetina | 0,8598 | 0,4421 | 0,8275 | 0,9368 | 0,9569 |

Onde: R^2 : coeficiente de correlação.

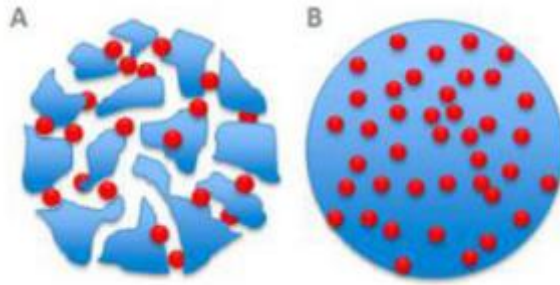
Quando o perfil de liberação do analito se enquadra no modelo de Higuchi, pode-se sugerir que a liberação seja controlada pelo mecanismo de difusão, ou seja, é provável que o artepelin C, formononetina e outros compostos com características semelhantes a eles se difundam pela membrana polimérica ou poros presentes nela a partir da degradação do polímero por hidrólise (SAMAHA; SHEHAYEB; KYRIACOS, 2009; LUCERO-ACUÑA; GUZMÁN, 2015; KAMALY et al., 2016; MENDES, 2019). Modos de liberação por difusão podem ser classificados a partir do cálculo de n (expoente difusional) a partir do modelo de Kormeyers-Peppas, que nesse caso foram de 0,96 (artepelin C) e 0,76 (formononetina). Valores de n entre 0,5 e 1 indicam que a liberação pode ocorrer pelo mecanismo não Fickiano de caso anômalo, onde ocorre o intumescimento e deformação do polímero concomitantemente com a difusão do fármaco pela membrana, como mostrado nas Figuras 39 e 40 (MENDES, 2019; SAMAHA; SHEHAYEB; KYRIACOS, 2009).

Figura 39 – Degradação e intumescimento do polímero em nanopartícula polimérica



Fonte: Adaptado de LUCERO-ACUÑA; GUZMÁN, 2015.

Figura 40 - Mecanismos de difusão de fármaco pela membrana ou matriz de nanopartículas poliméricas



Onde: A: difusão por poros na membrana polimérica; B: difusão a partir da matriz ou membrana polimérica.

Fonte: Adaptado de KAMALY et al., 2016

Cinéticas de liberação que se aplicam ao modelo de Hixson-Crowell sugerem que a liberação do fármaco esteja relacionada à eventos de erosão em massa ou superficial da estrutura, o que pode ocorrer com polímeros do tipo poliéster (GERAILI; MEQUANINT, 2020). Em casos de erosão superficial, o polímero vai sendo reduzido gradativamente, mantendo assim o formato inicial (SAMAH; SHEHAYEB; KYRIACOS, 2009; NIKRAVAN; HADDADI-ASL; SALAMI-KALAJAHI, 2019; GERAILI; MEQUANINT, 2020).

5.8 AVALIAÇÃO E COMPARAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS LIVRES E ENCAPSULADOS

5.8.1 Linhagens celulares

LNCaP, DU145 e PC-3 são as linhagens celulares de câncer de próstata mais exploradas na literatura científica, todas sendo células metastáticas, de baixa, média e alta agressividade, respectivamente (RAVENNA et al., 2014). As células do tipo PC-3 são provenientes de metástase óssea e não expressam receptores andrógenos sendo, portanto, insensíveis à esses hormônios (LIMA et al., 2018).

Além da análise da citotoxicidade das nanoestruturas em células tumorais, foi avaliada a sua atividade citotóxica em célula de fibroblastos normais. A OECD recomenda o uso de células do tipo 3T3 ou queratinócitos humanos normais para determinar doses iniciais para testes *in vivo* de toxicidade aguda oral (OECD, 2010), sendo ambas as linhagens, portanto, as mais utilizadas em protocolos de avaliação de citotoxicidade em células normais (TOMODA et al., 2020, LEIBIGER et al., 2013).

5.8.2 Citotoxicidade *in vitro* dos extratos livres e encapsulados em células PC-3 e 3T3

O ensaio de captura do corante vermelho neutro é recomendado por organizações como a OECD e a ISO e permite avaliar a viabilidade de células a um baixo custo (OECD, 2017). O corante vermelho é permeável à membrana de células viáveis em pH fisiológico. Uma vez no citoplasma, esse corante é direcionado ao interior dos lisossomos e permanece nesse ambiente por adquirir carga positiva devido à diferença de pH no interior dessas organelas, sendo possível então quantificar a incorporação do corante nos lisossomos por espectrofotometria (ISO, 2009; ATES et al., 2017; OECD, 2017).

Os valores de IC_{50} obtidos no ensaio de captura do corante vermelho neutro estão descritos nas Tabelas 22 e 23 e as Figuras 41 a 43 mostram a viabilidade das células PC-3 após 24 e 48h de tratamento com os extratos livres (PV e PVB) e nanocarreadores (NC-PV, NC-PVB e NC-B). As Figuras 44 a 46 apresentam a viabilidade de células 3T3 decorridos 24h de exposição aos extratos e nanocápsulas.

Tabela 22 - Valores de IC_{50} e concentração em partículas/mL para os extratos de própolis livre e encapsulados em ensaio de viabilidade celular de células PC-3 por captura do corante vermelho neutro

| Amostra | 24h | | 48h | |
|---------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|--------------------|
| | IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | Partículas/mL | IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | Partículas/mL |
| PV | $28,60 \pm 3,06$ | N.A. | $35,97 \pm 0,01$ | N.A. |
| NC-PV | $34,16 \pm 5,52$ | $3,06 \times 10^{10}$ | $8,91 \pm 2,24$ | $7,97 \times 10^9$ |
| PVB | $10,28 \pm 2,24$ | N.A. | $5,52 \pm 1,94$ | N.A. |
| NC-PVB | $9,28 \pm 4,31$ | $9,98 \times 10^9$ | $4,85 \pm 1,37$ | $5,21 \times 10^9$ |

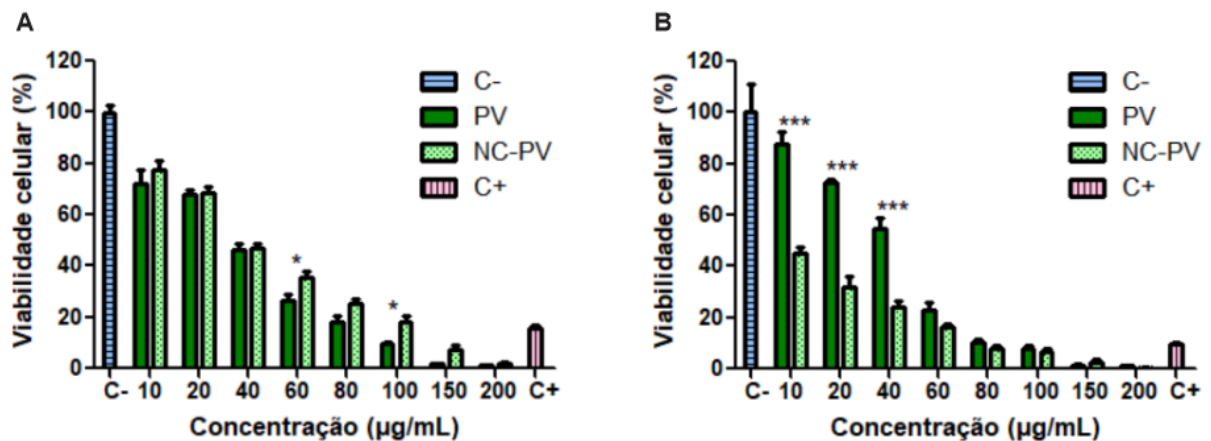
Onde: IC_{50} : metade da concentração inibitória máxima; PV: extrato de própolis verde; NC-PV: nanocápsula contendo extrato de própolis verde; PVB: extrato de própolis vermelha brasileira; NC-PVB: nanocápsula contendo extrato de própolis vermelha brasileira; NC-B: nanocápsula sem extrato de própolis; N.A.: não se aplica.

Tabela 23 - Valores de IC₅₀ e concentração em partículas/mL para os extratos de própolis livre e encapsulados em ensaio de viabilidade celular de células 3T3 por captura do corante vermelho neutro

| Amostra | IC ₅₀ (µg/mL) | Partículas/mL |
|---------|--------------------------|----------------------|
| PV | 50,33 ± 3,08 | N.A. |
| NC-PV | 7,61 ± 1,97 | 6,81x10 ⁹ |
| PVB | 7,70 ± 0,34 | N.A. |
| NC-PVB | 7,92 ± 4,79 | 8,51x10 ⁹ |

Onde: IC₅₀: metade da concentração inibitória máxima; PV: extrato de própolis verde; NC-PV: nanocápsula contendo extrato de própolis verde; PVB: extrato de própolis vermelha brasileira; NC-PVB: nanocápsula contendo extrato de própolis vermelha brasileira; NC-B: nanocápsula sem extrato de própolis; N.A.: não se aplica.

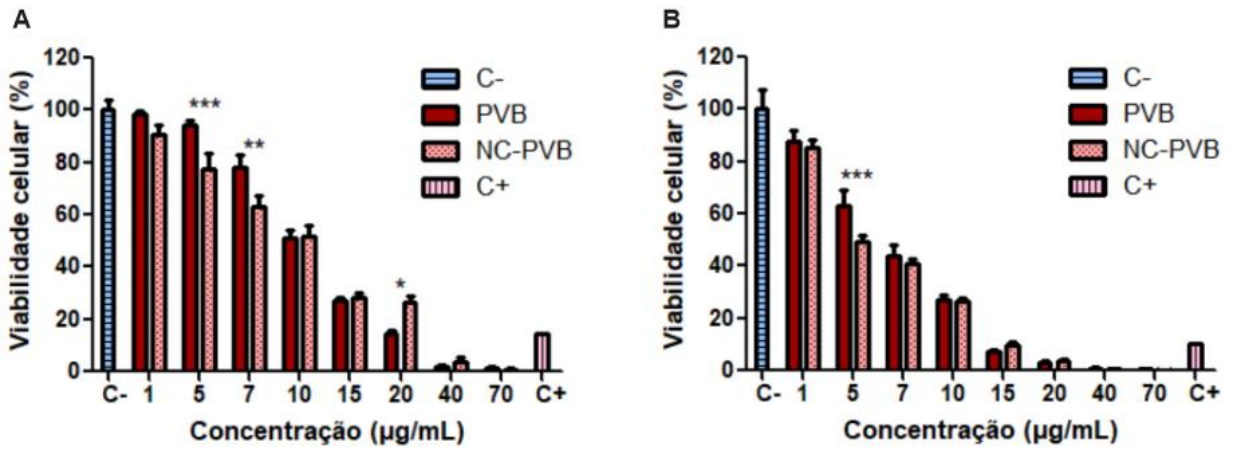
Figura 41 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com extrato de própolis verde livre (PV) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PV) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24 (A) e 48h (B)



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); PV: extrato de própolis verde; NC-PV: nanocápsula contendo extrato de própolis verde; *p < 0,05, ***p < 0,001 para NC-PV em relação a PV.

Fonte: Elaborado pelo autor.

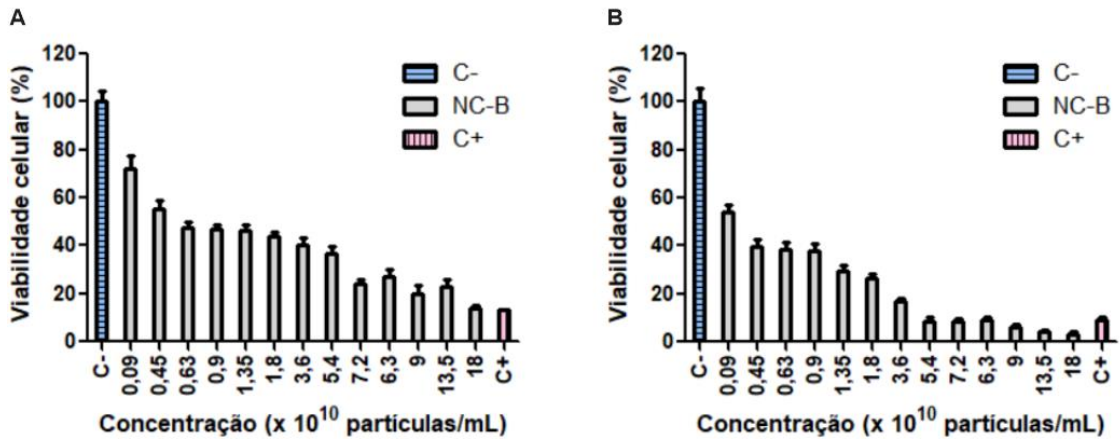
Figura 42 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com extrato de própolis vermelha brasileira livre (PVB) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PVB) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24 (A) e 48h (B)



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); PVB: extrato de própolis vermelha brasileira; NC-PVB: nanocápsula contendo extrato de própolis vermelha brasileira; * p>0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 para NC-PVB em relação a PVB.

Fonte: Elaborado pelo autor.

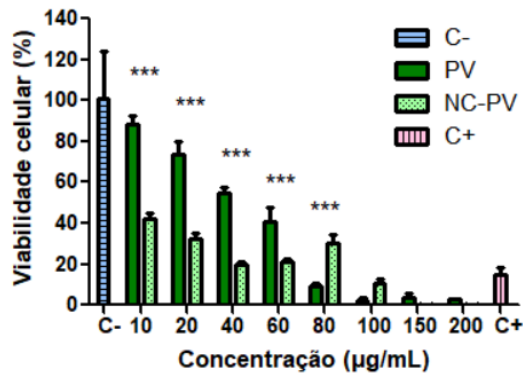
Figura 43 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com nanocápsulas vazias (NC-B) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24 (A) e 48h (B)



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); NC-B: nanocápsula sem extrato de própolis.

Fonte: Elaborado pelo autor.

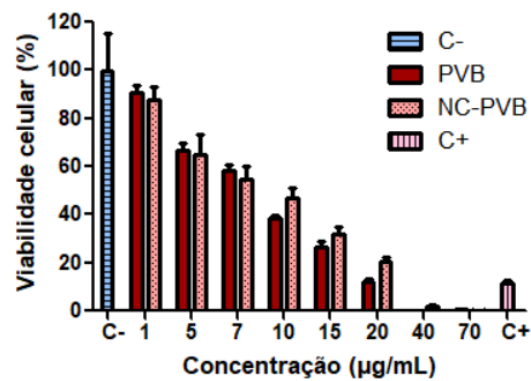
Figura 44 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com extrato de própolis verde livre (PV) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PV) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24h



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); PV: extrato de própolis verde; NC-PV: nanocápsula contendo extrato de própolis verde; *** $p < 0,001$ para NC-PV em relação a PV.

Fonte: Elaborado pelo autor.

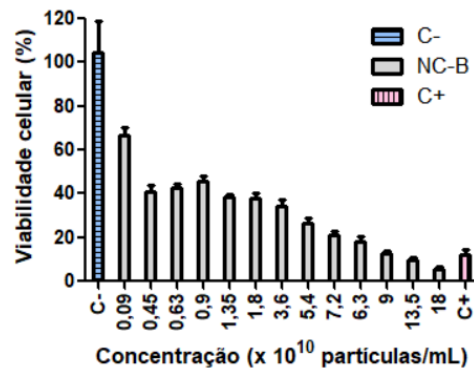
Figura 45 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com extrato de própolis vermelha brasileira livre (PVB) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PVB) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24h



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); PVB: extrato de própolis vermelha brasileira; NC-PVB: nanocápsula contendo extrato de própolis vermelha brasileira.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 46 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com nanocápsulas vazias (NC-B) a partir de ensaio por captura do corante vermelho neutro em 24h



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); NC-B: nanocápsula sem extrato de própolis.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Ensaio de citotoxicidade podem envolver medidas de diversos tipos de eventos, como metabolismo, crescimento ou dano celular, sendo recomendado o uso de diferentes métodos para que seja possível ter resultados e interpretações mais confiáveis (OECD, 2017). Tanto o metabolismo reduzido de células senis quanto as alterações que nanomateriais podem promover nas funções celulares podem alterar ou comprometer os resultados de ensaios que dependem das atividades metabólicas celulares (HENG et al., 2010; LIGASOVÁ; KOBERNA, 2019).

Dessa forma, seria interessante avaliar a viabilidade das células PC-3 e 3T3 a partir de um segundo processo que preferencialmente não dependesse da atividade metabólica celular, uma vez que o primeiro ensaio foi realizado por captura do corante vermelho neutro, que necessita de células com lisossomas íntegros e funcionais para gerar resultados.

O ensaio de quantificação de ácidos nucleicos utilizando o *NanoDrop Lite Spectrophotometer* permite obter a quantidade de dsDNA de forma específica (GARCÍA-ALEGRÍA et al., 2020). As Tabelas 24 e 25 mostram os valores de IC₅₀ obtidos no ensaio de quantificação de DNA. As Figuras 47 a 49 mostram a viabilidade das células PC-3 após 24 e 48h de exposição aos extratos livres e encapsulados e nanocarreador vazio, enquanto as Figuras 50 a 52 apresentam a viabilidade de células 3T3 decorridos 24h de exposição aos tratamentos.

Tabela 24 - Valores de IC₅₀ e concentração em partículas/mL para os extratos de própolis livre e encapsulados em ensaio de viabilidade celular de células PC-3 por quantificação de dupla fita de DNA

| Amostra | 24h | | 48h | |
|---------|--------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| | IC ₅₀ (µg/mL) | Partículas/mL | IC ₅₀ (µg/mL) | Partículas/mL |
| PV | 51,08 ± 2,07 | N.A. | 36,31 ± 8,23 | N.A. |
| NC-PV | 37,36 ± 0,43 | 3,34x10 ¹⁰ | 12,83 ± 0,28 | 1,15x10 ¹⁰ |
| PVB | 9,91 ± 2,85 | N.A. | 6,66 ± 0,22 | N.A. |
| NC-PVB | 9,23 ± 1,85 | 9,92x10 ⁹ | 7,01 ± 0,49 | 7,54x10 ⁹ |

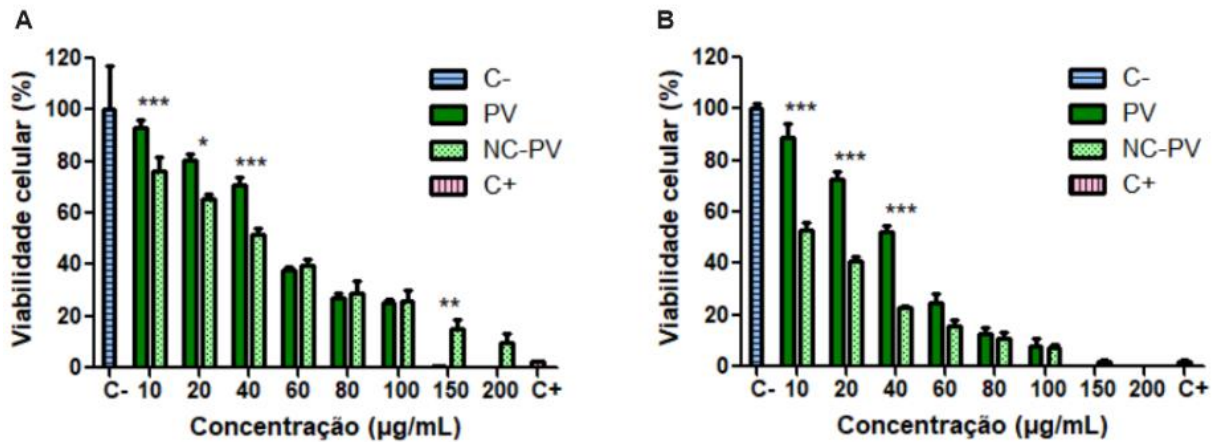
Onde: IC₅₀: metade da concentração inibitória máxima; PV: extrato de própolis verde; NC-PV: nanocápsula contendo extrato de própolis verde; PVB: extrato de própolis vermelha brasileira; NC-PVB: nanocápsula contendo extrato de própolis vermelha brasileira; NC-B: nanocápsula sem extrato de própolis; N.A.: não se aplica.

Tabela 25 - Valores de IC₅₀ e concentração em partículas/mL para os extratos de própolis livre e encapsulados em ensaio de viabilidade celular de células 3T3 por quantificação de dupla fita de DNA

| Amostra | IC ₅₀ (µg/mL) | Partículas/mL |
|---------|--------------------------|-----------------------|
| PV | 33,73 ± 3,54 | N.A. |
| NC-PV | 23,32 ± 3,85 | 2,09x10 ¹⁰ |
| PVB | 12,05 ± 2,75 | N.A. |
| NC-PVB | 12,00 ± 4,01 | 1,29x10 ¹⁰ |

Onde: IC₅₀: metade da concentração inibitória máxima; PV: extrato de própolis verde; NC-PV: nanocápsula contendo extrato de própolis verde; PVB: extrato de própolis vermelha brasileira; NC-PVB: nanocápsula contendo extrato de própolis vermelha brasileira; NC-B: nanocápsula sem extrato de própolis; N.A.: não se aplica.

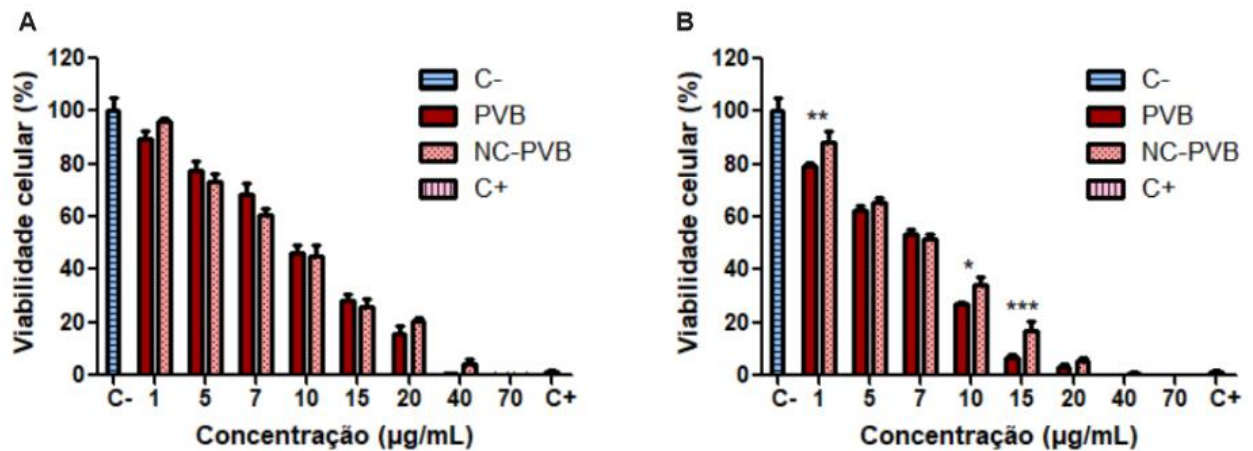
Figura 47 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com extrato de própolis verde livre (PV) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PV) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24 (A) e 48h (B)



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); PV: extrato de própolis verde; NC-PV: nanocápsula contendo extrato de própolis verde; * p > 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 para NC-PV em relação a PV.

Fonte: Elaborado pelo autor.

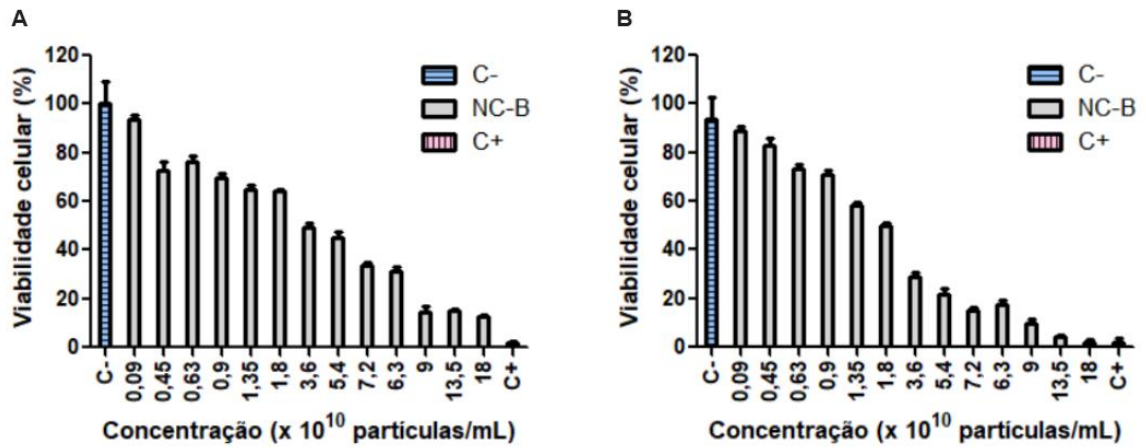
Figura 48 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com extrato de própolis vermelha brasileira livre (PVB) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PVB) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24 (A) e 48h (B)



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); PVB: extrato de própolis vermelha brasileira; NC-PVB: nanocápsula contendo extrato de própolis vermelha brasileira; * p > 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 para NC-PVB em relação a PVB.

Fonte: Elaborado pelo autor.

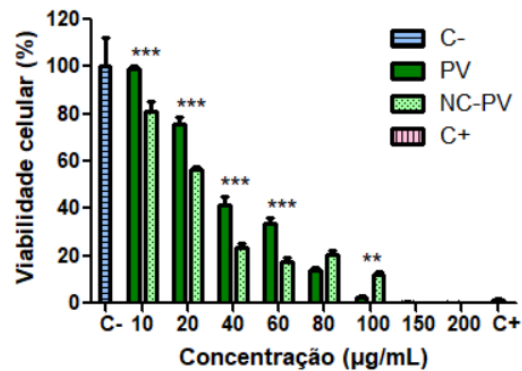
Figura 49 - Viabilidade das células PC-3 tratadas com nanocápsulas vazias (NC-B) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24 (A) e 48h (B)



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); NC-B: nanocápsula sem extrato de própolis.

Fonte: Elaborado pelo autor.

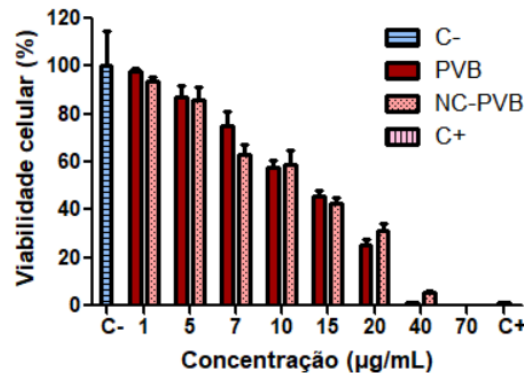
Figura 50 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com extrato de própolis verde livre (PV) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PV) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24h



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); PV: extrato de própolis verde; NC-PV: nanocápsula contendo extrato de própolis verde; ** p<0,01; *** p<0,001 para NC-PV em relação a PV.

Fonte: Elaborado pelo autor.

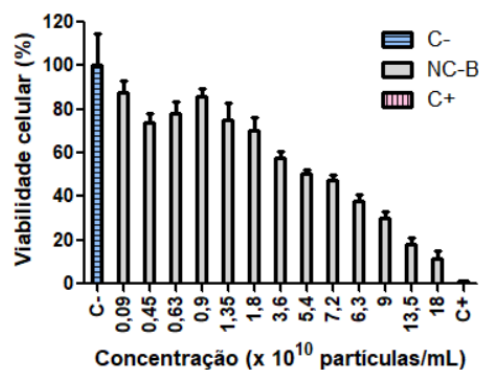
Figura 51 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com extrato de própolis vermelha brasileira livre (PVB) e encapsulado em nanocápsulas (NC-PVB) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24h



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); PVB: extrato de própolis vermelha brasileira; NC-PVB: nanocápsula contendo extrato de própolis vermelha brasileira.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 52 - Viabilidade das células 3T3 tratadas com nanocápsulas vazias (NC-B) a partir de ensaio por quantificação de dupla fita de DNA em 24h



Onde: C-: controle negativo; C+: controle positivo (DMSO 20 %); NC-B: nanocápsula sem extrato de própolis.

Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com a classificação de citotoxicidade de extratos proposta por Indrayanto, Putra e Suhud (2021), o extrato de PV apresentou atividade citotóxica moderada (IC₅₀ de 28,60 a 51,08 µg/mL) enquanto o extrato de PVB demonstrou uma citotoxicidade de moderada a alta (IC₅₀ de 5,52 a 10,28 µg/mL) em ambos ensaios de viabilidade celular realizados em células PC-3 (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021).

Foi possível observar um efeito citotóxico dose e tempo dependente em células PC-3, uma vez que a viabilidade celular diminuiu com o aumento das concentrações das amostras e os valores de IC₅₀, em sua maioria, foram inferiores após 48h de tratamento, tanto para os extratos livres quanto encapsulados. Klippstein et al. (2015) avaliaram a viabilidade de células do tipo CT26 (câncer colorretal) após 24 e 72h de tratamento com curcumina livre e

encapsulada em nanocápsulas de poli (ácido lático co-ácido glicólico) (PLGA) e observaram uma maior citotoxicidade para ambos os tratamentos após 72h com efeito pronunciado das nanopartículas carregadas em comparação à curcumina livre (KLIPPSTEIN et al., 2015).

A atividade antitumoral dos diferentes compostos presentes nos extratos de própolis pode ocorrer por mecanismos que envolvem estímulos de apoptose, como a ativação da cascata de caspases ou de receptores do tipo fator de necrose tumoral (TNF) ou TRAIL, interrupção do ciclo celular, interferência em processos metabólicos, redução de angiogênese ou da sinalização de oncogenes, modulação do microambiente tumoral, inibição de IGF, além de efeito pró-oxidante, com acúmulo de espécies reativas de oxigênio intracelular e consequente morte celular (PREMRATANACHAI; CHANCHAO, 2014; PATEL, 2016; RAHAIEE et al., 2020). As principais classes de substâncias responsáveis por esses efeitos são os compostos fenólicos, dentre eles os ácidos fenólicos e flavonoides (flavonas, flavonóis, isoflavonóides), terpenos, benzofenonas, xantonas, taninos e catequinas (DE MENDONÇA et al., 2015; PATEL, 2016). As atividades biológicas das própolis podem variar dependendo do tipo e quantidade em que essas substâncias estão presentes nos extratos.

Com relação ao extrato de PV, o extrato encapsulado (NC-PV) foi mais citotóxico em comparação ao extrato livre (PV) já em 24h (Tabela 25), indicando uma possível vantagem da nanoencapsulação desse extrato, evento este que pode ocorrer por maior internalização e acúmulo das nanoestruturas no interior das células (AFSHARZADEH et al., 2020; SHITOLE et al., 2020). Além disso, o encapsulamento da PV nas nanocápsulas reduziu o valor de IC₅₀ em até 4x após o tratamento das células por 48h (Tabela 23 e 25).

O extrato de PVB, tanto na forma livre quanto encapsulado, foi mais citotóxico para células PC-3 em relação ao extrato de PV, o que corrobora com um estudo comparativo de extratos etanólicos de PV e PVB realizado por Moraes et al. (2010) em células de câncer de próstata humano do tipo RC-58T/h/AS#4 e células de epitélio prostático humano PrEC (MORAES et al., 2010). Essa discrepância de citotoxicidade pode ser atribuída a diferença na composição dos extratos, a maior quantidade de flavonoides totais e atividade antioxidante que identificamos no extrato de PVB, além da possível presença de outros compostos com atividade antitumoral nesse extrato, como as benzofenonas.

Por outro lado, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) de potencial citotóxico na comparação entre extrato livre de PVB e encapsulado (NC-PVB) em nenhum dos testes *in vitro*. Rodrigues avaliou a atividade antitumoral em células PC-3 e LNCaP de um extrato de PVB brasileiro também obtido da cidade de Canavieiras (BA) positivo para liquiritigenina, isoliquiritigenina, vestitol, além de outros isoflavonoides e benzofenonas (RODRIGUES, J.

C.Z., 2021). No estudo verificou-se uma resistência das células PC-3 ao extrato não observada na linhagem LNCaP, evento este que o autor sugere estar relacionado ao fato de a PVB ter um papel importante na indução de apoptose, sendo as células do tipo PC-3 menos sensíveis a esse evento possivelmente devido à sua maior agressividade (RODRIGUES, J. C. Z., 2021), fato este que pode ter contribuído para que as NC-PVB não apresentassem efeito citotóxico superior ao extrato livre nas células PC-3.

Considerando o fato de não ter sido possível avaliar o perfil de liberação de todos os compostos majoritários do extrato de PVB ou em meios de liberação com diferentes valores de pH, deve-se considerar a possibilidade de retenção dessas substâncias com atividade antitumoral nas nanoestruturas, uma vez que a liberação depende não somente das características do nanocarreador mas também das substâncias encapsuladas nestes (KORANG-YEBOAH et al., 2015). Saravanakumar e colaboradores avaliaram a liberação de um metabólito fúngico (TM2) a partir de nanopartículas de quitosan em PBS com diferentes pHs e observaram um melhor perfil quando em pH 5,8 em comparação a 7,4 (SARAVANAKUMAR et al., 2021).

Outra explicação desse fato seria uma eventual dificuldade de internalização do arranjo estrutural único das NC-PVB em células PC-3. A internalização celular de nanoestruturas ocorre especialmente por mecanismos de endocitose e que dependem, entre outros fatores, da interação do nanocarreador com a membrana celular e da capacidade furtiva dos ativos em relação à vesícula endossomal formada ao seu redor (DONAHUE; ACAR; WILHELM, 2019; SMITH et al., 2019). Além disso, é possível que os compostos bioativos da PVB possam ter sido liberados das nanocápsulas no meio de cultura antes da internalização destas (SANNA et al., 2017).

Apesar das NC-PVB não terem sido vantajosas em relação ao extrato livre de PVB nos ensaios *in vitro* realizados, muitos trabalhos disponíveis na literatura científica exploram os benefícios das nanopartículas poliméricas na terapêutica, como a possibilidade de redução de doses de ativos e da quantidade em que devem ser administradas, dos efeitos adversos de fármacos potencialmente tóxicos, da facilidade de direcionamento passivo por meio do efeito EPR, com acúmulo de substâncias com efeito biológico no microambiente tumoral, melhora do tempo de circulação de ativos, protegendo-os de formas de degradação naturais do organismo, como hidrólise e ação de enzimas, prevenindo eventos de opsonização e fagocitose pelas células do sistema imune, além da viabilidade de promoção de liberação modificada ou prolongada de fármacos (MASOOD, 2016; DE LÁZARO; MOONEY, 2021; ELOI; ABRIATA; MARCHETTI, 2021).

As NC-B também apresentaram atividade citotóxica em células PC-3. Esse efeito citotóxico era esperada devido ao potencial antitumoral dos demais componentes da formulação, como o Kolliphor[®] P407 e a tributirina. Os poloxâmicos são capazes de produzir bolhas na membrana celular de algumas células tumorais ou de se incorporarem à estas, promovendo alterações importantes na função destas células (ALLOTEY-BABINGTON et al., 2018; ZHANG et al., 2010). Já a tributirina apresenta atividade citotóxica relatada na literatura em linhagens celulares de câncer de próstata (MAIER et al., 2000).

Os extratos de própolis foram capazes de reduzir a viabilidade de células 3T3. Um estudo realizado com extratos de PVB provenientes de diferentes regiões do Brasil (Sergipe, Alagoas e Paraíba) em células HaCaT (queratinócitos) e 3T3 evidenciou o potencial tóxico desse tipo de própolis em células humanas normais (LOPEZ et al., 2015). Além disso os nanocarreadores estudados também reduziram a viabilidade das células 3T3, demonstrando não serem seletivos para as células tumorais. Esse resultado pode ter ocorrido pelo fato de não ter sido realizada nenhuma funcionalização na superfície das nanopartículas de forma a direcionar as mesmas para as células tumorais de forma ativa; espera-se que essas partículas, devido ao seu reduzido diâmetro (menor que 250 nm) apresentem um direcionamento passivo *in vivo*, promovido pelo efeito EPR, diminuindo assim a sua citotoxicidade em células normais. Entretanto, é necessário realizar uma melhor avaliação da segurança tanto *in vitro* como *in vivo* destas formulações.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho buscou explorar uma nova combinação de materiais para nanoencapsular extratos de própolis resultando em uma formulação que pudesse futuramente ser aplicável como terapia principal ou adjuvante contra o câncer, focando especialmente no adenocarcinoma de próstata, além de permitir a realização paralela de um estudo comparativo da atividade citotóxica desses extratos em uma linhagem celular metastática desse tipo de câncer.

Considerando as características dos extratos de PV e PVB descritas na literatura e os resultados de caracterização destes extratos obtidos no presente trabalho, foi possível explorar algumas das diferenças de composição entre esses materiais, evidenciando uma possível vantagem do uso do extrato de PVB em relação ao de PV em terapias anticâncer devido ao seu maior teor de flavonoides totais e potencial antioxidante, diferenças essas que, associadas à coparticipação de outros compostos com atividade citotóxica, podem auxiliar na compreensão da atividade biológica de cada extrato.

Como parte dos estudos de formulação, o planejamento experimental desenvolvido para otimizar a obtenção dessa formulação possibilitou conhecer a influência de três diferentes variáveis envolvidas no preparo das nanocápsulas (concentrações de polímero, estabilizante e óleo), evidenciando a utilidade desse tipo de metodologia para a obtenção de um produto final de acordo com as características desejadas e a partir de um reduzido número de experimentos.

Por meio das análises de caracterização das nanopartículas, foram identificadas estruturas do tipo *core-shell* com diâmetros considerados adequados para a promoção de um direcionamento passivo dessas nanoestruturas ao microambiente tumoral a partir da administração intravenosa e características de superfície que poderiam contribuir para a sua permanência na circulação sanguínea até a chegada ao destino final, além de ser verificado o encapsulamento dos biomarcadores dos extratos nas nanocápsulas. A partir do ensaio de perfil de liberação *in vitro*, foi possível evidenciar os principais mecanismos de liberação do artepelin C e formononetina a partir das nanoestruturas e mostrar o potencial de liberação prolongada proporcionado pela nanoencapsulação.

O método desenvolvido durante a condução do trabalho para a análise do extrato de PV por UPLC/MS, além de poder ser utilizado para a caracterização e quantificação de três compostos presentes neste material, oferece uma estratégia para a determinação de forma indireta da eficiência de encapsulamento dessas substâncias em nanoestruturas. As análises de eficiência de encapsulamento utilizadas comprovaram o potencial dos nanocarreadores desenvolvidos em encapsular os extratos de PV e PVB.

Por fim, a partir dos ensaios de viabilidade celular demonstrou-se o potencial citotóxico dos extratos de PV e PVB incorporados às nanocápsulas desenvolvidas em células da linhagem PC-3, destacando-se a atividade citotóxica superior das NC-PVB em comparação com as NC-PV que, por sua vez, mostraram-se consideravelmente mais vantajosas do que o extrato livre.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho traz evidências suficientes de que as formulações de nanocápsulas desenvolvidas podem ser consideradas sistemas promissores para a terapia do câncer de próstata. Porém, para uma maior compreensão do potencial de uso dessas formulações, é relevante a realização de estudos futuros onde se possa avaliar as suas atividades biológicas em outras linhagens celulares e os seus efeitos *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AARON, L. T.; FRANCO, O. E.; HAYWARD, S. W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. **Urologic Clinics of North America**, v. 43, n. 3, p. 279–288, 2016.

AFSHARZADEH, M. et al. PEG-PLA nanoparticles decorated with small-molecule PSMA ligand for targeted delivery of galbanic acid and docetaxel to prostate cancer cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 5, p. 4618–4630, 2020.

AHLAWAT, J.; HENRIQUEZ, G.; NARAYAN, M. Enhancing the delivery of chemotherapeutics: Role of biodegradable polymeric nanoparticles. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 1–20, 2018.

AHMAD, A. et al. Precision Cancer Nanotherapy: Evolving Role of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Active Targeting. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 23, p. 10475–10496, 2019.

ALAKHOVA, D. Y. et al. Differential metabolic responses to pluronic in MDR and non-MDR cells: A novel pathway for chemosensitization of drug resistant cancers. **Journal of Controlled Release**, v. 142, n. 1, p. 89–100, fev. 2010.

ALDANA-MEJIA, J. A. et al. Nonclinical Toxicological Studies of Brazilian Red Propolis and Its Primary Botanical Source *Dalbergia ecastaphyllum*. **Chemical Research in Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 1024–1033, 2021.

ALJUFFALI, I. A. et al. Nanomedicine as a Strategy for Natural Compound Delivery to Prevent and Treat Cancers. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 27, p. 4219–4231, 2016.

ALLOTEY-BABINGTON, G. L. et al. Cancer chemotherapy: Effect of poloxamer modified nanoparticles on cellular function. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 47, p. 181–192, 1 out. 2018.

ALSHAMSAN, A. Nanoprecipitation is more efficient than emulsion solvent evaporation method to encapsulate cucurbitacin I in PLGA nanoparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, n. 3, p. 219–222, 2014.

ANDRADE, J. K. S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, 2017.

ARAUJO, C. R. R. et al. Total antioxidant capacity, total phenolic content and mineral elements in the fruit peel of *Myrciaria cauliflora*. **Braz. J. Food Technol.**, v. 16, n. 4, p. 301–309, 2013.

ARLUISON, V.; WIEN, F. **Methods in Molecular Biology. RNA Spectroscopy: Methods and Protocols**. New York: Humana Press, 2020. v. 2113.

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

ARMENTANO, I. et al. **Chapter 5 - Multifunctional nanostructured biopolymeric materials for therapeutic applications**. Bucharest: Nanostructures for Novel Therapy. 2017. p. 107–135.

ATES, G. et al. **Chapter 2 - Assaying cellular viability using the neutral red uptake assay**. In: Cell Viability Assays: Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2017. v. 1601. p. 19–26.

BANIK, B. L.; FATTAHI, P.; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles: The future of nanomedicine. **WIREs Nanomed Nanobiotechnol**, v. 8, p. 271-299, 2016.

BARAR, J.; OMIDI, Y.; GUMBLETON, M. 12 - Molecular Targeted Therapy of Lung Cancer: Challenges and Promises. In: **Pulmonary Drug Delivery: Advances and Challenges**. Wiley. 2015.

BATISTA, L. L. V. et al. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. **Rev. Col. Bras. Cir**, v. 39, n. 6, p. 515–520, 2012.

BAYDA, S. et al. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2020.

BENNET, D.; KIM, S. **Chapter 8 - Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery**. In: Application of Nanotechnology in Drug Delivery. London: IntechOpen. 2014.

BERLINCK, R. Flavonoid Dimers from Brazilian Red Propolis have Anti-Proliferative Activity on Cancer Cells. **Organic Chemistry of Biological Systems**, 2020. Disponível em: <<https://qosbioiqsc.blog/2020/09/20/flavonoid-dimers-from-brazilian-red-propolis-have-anti-proliferative-activity-on-cancer-cells/>>. Acesso em: 05 de out. 2021.

BERNARDI, F.; NICOLINI, K. P.; NICOLINI, J. Uso de espectroscopia de ultravioleta visível (UV-VIS) para a detecção de quercetina em plantas por meio da formação do complexo quercetina-alumínio. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 29, n. 3, p. 271–276, 25 set. 2017.

BERRETTA, A. A. et al. **Chapter 4 - Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market**. In: Superfood and Functional Food - An Overview of Their Processing and Utilization. InTech. 2017. p. 56–98.

BERRETTA, A. A. et al. Propolis and its potential against SARS-CoV-2 infection mechanisms and COVID-19 disease. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 131, 2020.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BOTTEON, C. E. A. et al. Biosynthesis and characterization of gold nanoparticles using Brazilian red propolis and evaluation of its antimicrobial and anticancer activities. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–16, 2021.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. u. Technol.**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa** nº 03, de 19 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC** nº 166, de 24 de julho de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA. 2019.

BRUINSMANN, F. A. et al. Chitosan-coated nanoparticles: Effect of chitosan molecular weight on nasal transmucosal delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, p. 1–19, 2019.

BRUSCHI, M. L. et al. **Chapter 12 - Nanostructured therapeutic systems with bioadhesive and thermoresponsive properties**. In: Nanostructures for Novel Therapy. Elsevier. 2017.

CADETE, A. et al. Self-assembled hyaluronan nanocapsules for the intracellular delivery of anticancer drugs. **Scientific Reports**, v. 9, n. 11565, p. 1–11, 2019.

CAÑADAS, O.; CASALS, C. **Chapter 5 - Differential Scanning Calorimetry of Protein–Lipid Interactions**. In: Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer Science+Business Media. 2019. v. 2003. p. 91–106.

CAPEK, I. Preparation and Functionalization of Gold Nanoparticles. **J. Surface Sci. Technol.**, v. 29, n. 3-4, p. 1-18, 2013.

CHANG, T. M. S. PEG-PLA Nanocapsules Containing a Nanobiotechnological Complex of Polyhemoglobin-Tyrosinase for the Depletion of Tyrosine in Melanoma: Preparation and In Vitro Characterisation. **Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery**, v. 2, n. 1, 2012.

CHERRAK, S. A. et al. In vitro antioxidant versus metal ion chelating properties of flavonoids: A structure-activity investigation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–21, 2016.

CHOWDHURY-PAULINO, I. M. et al. Racial disparities in prostate cancer among black men: epidemiology and outcomes. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, p. 1–6, 2021.

CIMADAMORE, A. et al. Prostate cancer in 2021: Novelty in prognostic and therapeutic biomarker evaluation. **Cancers**, v. 13, n. 14, p. 1–12, 2021.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission Decision** of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (2002/657/EC). Official Journal of the European Communities. 2002.

CONTRI, R. V. et al. Vegetable oils as core of cationic polymeric nanocapsules: Influence on the physicochemical properties. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 8, n. 7–8, p. 913–924, 2013.

CORRÊA, D. H. A. et al. Dehydrocrotonin and its β -cyclodextrin complex: Cytotoxicity in V79 fibroblasts and rat cultured hepatocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 510, n. 1–2, De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

p. 17–24, 2005.

DANAEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 1–17, 2018.

DANTAS SILVA, R. P. et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 30 mar. 2017.

DAUDT, R. M. et al. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Cienc. Cult.**, v. 65, n. 3, p. 28–31, 2013.

DE LÁZARO, I.; MOONEY, D. J. Obstacles and opportunities in a forward vision for cancer nanomedicine. **Nature Materials**, 2021.

DE MENDONÇA, I. C. G. et al. Brazilian red propolis: Phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, 14 out. 2015.

DENG, S. et al. Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: Current status, challenges and opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, 2020.

DO NASCIMENTO, A. M. **Avaliação da qualidade de extratos de Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2008.

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, 2016.

DORNAS, G. P. **Processamento e caracterização de mantas de nanofibras de poli (álcool vinílico) (PVOH) com própolis obtidas por eletrofição**. Belo Horizonte: Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. 2018.

DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Anal. Chem.**, v. 31, n. 7, p. 1184–1187, 1959.

EDIRIWICKREMA, A.; SALTZMAN, W. M. Nanotherapy for Cancer: Targeting and Multifunctionality in the Future of Cancer Therapies. **ACS Biomaterials Science and Engineering**, v. 1, n. 2, p. 64–78, 2015.

ELOI, J. O.; ABRIATA, J. P.; MARCHETTI, J. M. **Nanocarriers for drug delivery - Concepts and Applications**. São Carlos: Springer. 2021.

ELSAWY, M. A. et al. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. April, p. 1346–1352, 2017.

ENDO, S. et al. Selective inhibition of human type-5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3) by baccharin, a component of Brazilian propolis. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 716–721, 2012.

ENDO, S. et al. Synthesis of non-prenyl analogues of baccharin as selective and potent
De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

inhibitors for aldo-keto reductase 1C3. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 19, p. 5220–5233, 2014.

ENDO, S. et al. Autophagy inhibition enhances anticancer efficacy of artemisinin, a cinnamic acid derivative in Brazilian green propolis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 497, p. 437–443, 26 fev. 2018.

ENRICO, C. **Chapter 3 - Nanotechnology-Based Drug Delivery of Natural Compounds and Phytochemicals for the Treatment of Cancer and Other Diseases**. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, v 62. Elsevier. 2019.

ESCRICHE, I.; JUAN-BORRÁS, M. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. **Food Research International**, v. 106, n. November 2017, p. 834–841, 2018.

FAKHARI, A.; CORCORAN, M.; SCHWARZ, A. Thermogelling properties of purified poloxamer 407. **Heliyon**, v. 3, n. 8, e- 00390, 2017.

FERREIRA, C. D.; NUNES, I. L. Oil nanoencapsulation: development, application, and incorporation into the food market. **Nanoscale Research Letters**, v. 14, 2019.

FERREIRA, J. M. et al. New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3552–3558, 2017.

FERRO, M. et al. Biomarkers in localized prostate cancer. **Future Oncology**, v. 12, n. 3, p. 399–411, 2016.

FESSI, H. et al. Rapid Communication Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. R1–R4, 1989.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for industry considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology. Methods, Method Verification and Validation**. Office Regulatory Affairs (ORA) - ORA Laboratory Manual Volume II. 2020.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Methods, Method Verification and Validation**. Office Regulatory Affairs (ORA) - ORA Laboratory Manual Volume II. 2020.

FRANÇA, M.; RAMOS JÚNIOR, C. **Própolis verde mineira conquista mercado internacional**. 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br/index.php/ajuda/story/3605-propolis-verde-mineira-conquista-mercado-internacional>>. Acesso em: 05 de out. 2021.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **Eur J Med Chem**, v. 110, p. 267-279, 2016.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171–178, 2006.

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

GARCÍA-ALEGRÍA, A. M. et al. Quantification of DNA through the nanodrop spectrophotometer: Methodological validation using standard reference material and sprague dawley rat and human DNA. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2020, 2020.

GERAILI, A.; MEQUANINT, K. Systematic studies on surface erosion of photocrosslinked polyanhydride tablets and data correlation with release kinetic models. **Polymers**, v. 12, n. 5, 2020.

GUAN, J. et al. Regulation of in vivo delivery of nanomedicines by herbal medicines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 174, p. 210–228, 2021.

GUIMARÃES, K. C.; SALGADO, D. L.; CARVALHO, E. E. N. Evaluation of different methodologies for the determination of phenolic compounds in tropical fruits. **Braz. J. Food Technol.**, v. 23, n. e2019015, p. 1–7, 2020.

HARB, T. B. et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, n. April 2018, p. 2–6, 2016.

HASSAN, M. M.; OLAOYE, O. O. Recent advances in chemical biology using benzophenones and diazirines as radical precursors. **Molecules**, v. 25, n. 10, 2020.

HATA, T. et al. Artepillin C, a Major Ingredient of Brazilian Propolis, Induces a Pungent Taste by Activating TRPA1 Channels. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 2, p. 276–308, 2004.

HENG, B. C. et al. Comparative cytotoxicity evaluation of lanthanide nanomaterials on mouse and human cell lines with metabolic and DNA-quantification assays. **Biointerphases**, v. 5, n. 3, p. FA88–FA97, 2010.

HENRY, G. H. et al. A Cellular Anatomy of the Normal Adult Human Prostate and Prostatic Urethra. **Cell Rep.**, v. 25, n. 12, p. 3530–3542, 2019.

HU, J.; WANG, G.; SUN, T. Dissecting the roles of the androgen receptor in prostate cancer from molecular perspectives. **Tumor Biology**, v. 39, n. 5, 2017.

HUANG, W. J. et al. Formononetin induces the mitochondrial apoptosis pathway in prostate cancer cells via downregulation of the IGF-1/IGF-1R signaling pathway. **Pharm Biol**, v. 52, n. 4, p. 466–470, 1 abr. 2014.

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G. S.; SUHUD, F. **Chapter 6 - Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research**. In: Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, v. 46. Elsevier. 2021.

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION (ICH). **Guideline for Industry: Text on Validation of Analytical Procedures (ICH-Q2A)**. 1995.

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION (ICH). **Guidance for Industry - Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology**. 1996.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 10993-5:2009 (E) Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. 2009

IZIDORO, L. C. et al. Qualidade de vida relacionada à saúde e fatores psicossociais após prostatectomia radical. **Acta Paul Enferm**, v. 32, n. 2, p. 169–177, 2019.

JEREZ-ROIG, J. et al. Future burden of prostate cancer mortality in Brazil: a population-based study. **Cad. Saúde Pública**, v. 30, n. 11, p. 2451–2458, 2014.

JIANG, L. et al. Oleic acid induces apoptosis and autophagy in the treatment of Tongue Squamous cell carcinomas. **Scientific Reports**, v. 7, n. 11277, p. 1–11, 2017.

JOBIN, M. L.; ALVES, I. D. **Chapter 1 - The Contribution of Differential Scanning Calorimetry for the Study of Peptide/Lipid Interactions**. In: *Microcalorimetry of Biological Molecules: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, v. 1964. Springer Science+Business Media. 2019.

KAMALY, N. et al. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. **Chem Rev.**, v. 116, n. 4, p. 2602–2663, 2016.

KAMEL, R.; ABBAS, H.; SHAFFIE, N. M. Development and evaluation of PLA-coated micellar nanosystem of Resveratrol for the intra-articular treatment of arthritis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 569, n. 118560, 5 out. 2019.

KAPUSCINSKA, A.; OLEJNIK, A.; NOWAK, I. Chapter 8 - Nanocapsules as carriers of active substances. In: **Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics: Applications of Nanobiomaterials**. Elsevier. 2016.

KATO, H. et al. Dispersion characteristics of various metal oxide secondary nanoparticles in culture medium for in vitro toxicology assessment. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 3, p. 1009–1018, 2010.

KHAN, T. et al. The Prospect of Identifying Resistance Mechanisms for Castrate-Resistant Prostate Cancer Using Circulating Tumor Cells: Is Epithelial-to-Mesenchymal Transition a Key Player? **Prostate Cancer**, v. 2020, n. Article ID 7938280, p. 1–16, 2020.

KLIPPSTEIN, R. et al. Passively Targeted Curcumin-Loaded PEGylated PLGA Nanocapsules for Colon Cancer Therapy in Vivo. **Small**, v. 11, n. 36, p. 4704–4722, 2015.

KOLONKO, A. K. et al. Capsaicin-loaded chitosan nanocapsules for wtCFTR-mRNA delivery to a cystic fibrosis cell line. **Biomedicines**, v. 8, n. 9, 2020.

KOMURA, K. et al. Current treatment strategies for advanced prostate cancer. **International Journal of Urology**, v. 25, n. 3, p. 220–231, 2018.

KONG, B. et al. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Nanomedicine, v. 6, n. 5, p. 929–941, 2011.

KORANG-YEBOAH, M. et al. Polycaprolactone/maltodextrin nanocarrier for intracellular drug delivery: Formulation, uptake mechanism, internalization kinetics, and subcellular localization. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 4763–4781, 2015.

KOSHY, O.; SUBRAMANIAN, L.; THOMAS, S. **Chapter 5 - Differential Scanning Calorimetry in Nanoscience and Nanotechnology**. In: Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization. Elsevier. 2017.

KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 8–28, 2015a.

KRUVE, A. et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, v. 870, p. 29–44, 2015b.

LAKKIREDDY, H. R.; BAZILE, D. Building the design, translation and development principles of polymeric nanomedicines using the case of clinically advanced poly(lactide(glycolide))–poly(ethylene glycol) nanotechnology as a model: An industrial viewpoint. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 289–332, 2016.

LEE, C. H.; AKIN-OLUGBADE, O.; KIRSCHENBAUM, A. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 40, n. 3, p. 565–575, 2011.

LEIBIGER, C. et al. First molecular cytogenetic high resolution characterization of the NIH 3T3 cell line by murine multicolor banding. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 61, n. 4, p. 306–312, 2013.

LIGASOVÁ, A.; KOBERNA, K. Quantification of fixed adherent cells using a strong enhancer of the fluorescence of DNA dyes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

LIMA, A. R. et al. Discrimination between the human prostate normal and cancer cell exometabolome by GC-MS. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

LIOTTI, A. et al. Oleic acid promotes prostate cancer malignant phenotype via the G protein-coupled receptor FFA1/GPR40. **J Cell Physiol.**, v. 233, n. 9, p. 7367–7378, 2018.

LOEB, S.; GASHTI, S. N.; CATALONA, W. J. Exclusion of inflammation in the differential diagnosis of an elevated prostate-specific antigen (PSA). **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 27, n. 1, p. 64–66, 2009.

LOPEZ, B. G. C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: An alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 677–687, 2015.

LU, X. Y. et al. **Polymer nanoparticles**. In: Progress in Molecular Biology and Translational Science, v 107. Elsevier. 2011.

LUCERO-ACUÑA, A.; GUZMÁN, R. Nanoparticle encapsulation and controlled release of a hydrophobic kinase inhibitor: Three stage mathematical modeling and parametric analysis. De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

International Journal of Pharmaceutics, v. 494, n. 1, p. 249–257, 2015.

ŁYSIK, D. et al. The influence of mucin-based artificial saliva on properties of polycaprolactone and polylactide. **Polymers**, v. 11, n. 11, 2019.

MACHADO, B. A. S. et al. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–26, 2016.

MAIER, S. et al. Tributyrin induces differentiation, growth arrest and apoptosis in androgen-sensitive and androgen-resistant human prostate cancer cell line. **Int J Cancer**, v. 88, p. 245–251, 2000.

MARSON, B. M. et al. Validation of analytical methods in a pharmaceutical quality system: an overview focused on HPLC methods. **Quim. Nova**, v. 43, n. 8, p. 1190–1203, 2020.

MASOOD, F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy. **Materials Science and Engineering C**, v. 60, p. 569–578, 1 mar. 2016.

MELLO, B. B. F. D. **Desenvolvimento e caracterização de carreador lipídico nanoestruturado contendo própolis vermelha brasileira em formulações tópicas**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2022.

MENDES, A. P. P. **Cinética de liberação de clorexidina em nanocompósito de magnetita e quitosana**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos. 2019.

MIRANDA, M. A. et al. Assessing the cytotoxic potential of glycoalkaloidic extract in nanoparticles against bladder cancer cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 10, p. 1520–1531, 2019.

MODI, S.; ANDERSON, B. D. Determination of drug release kinetics from nanoparticles: Overcoming pitfalls of the dynamic dialysis method. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 8, p. 3076–3089, 2013.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. **Polymer-based nanocapsules for drug delivery** **International Journal of Pharmaceutics** Elsevier B.V., , 29 jan. 2010.

MORAES, C. et al. Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of Brazilian propolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n. 2, p. 539–543, 2010.

MOURA, S. et al. Poloxamer 407 based-nanoparticles for controlled release of methotrexate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 575, n. 118924, 15 fev. 2020.

NASEF, A. M.; GARDOUH, A. R.; GHORAB, M. M. Polymeric nanoparticles: influence of polymer, surfactant and composition of manufacturing vehicle on particle size. **World J Pharm Sci**, v. 3, n. 12, p. 2308–2322, 2015.

NEL, A.; RUOSLAHTI, E.; MENG, H. New Insights into “permeability” as in the Enhanced De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Permeability and Retention Effect of Cancer Nanotherapeutics. **ACS Nano**, v. 11, n. 10, p. 9567–9569, 2017.

NII, T.; ISHII, F. Encapsulation efficiency of water-soluble and insoluble drugs in liposomes prepared by the microencapsulation vesicle method. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 298, n. 1, p. 198–205, 2005.

NIKRAVAN, G.; HADDADI-ASL, V.; SALAMI-KALAJAHI, M. Stimuli-responsive DOX release behavior of cross-linked poly(acrylic acid) nanoparticles. **e-Polymers**, v. 2019, p. 203–214, 2019.

NOSSITER, J. et al. Hospital volume and outcomes after radical prostatectomy: a national population-based study using patient-reported urinary continence and sexual function. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, p. 1–7, 2021.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidance document on using cytotoxicity test to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. ENV/JM/MONO (2010)20. 2010.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Draft Guidance document on good in vitro method practices (GIVIMP) for the development and implementation of in vitro methods for regulatory use in human safety assesment**. 2017.

OLDENBOURG, R. Polarized light microscopy: Principles and practice. **Cold Spring Harb Protoc.**, v. 2013, n. 11. pdb.top078600, p. 1023–1036, 2013.

PATEL, S. Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents. **Journal of Dietary Supplements**, v. 13, n. 3, p. 245-268, 2016.

PEREIRA, G. G. et al. Formulation and characterization of Poloxamer 407[®]: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. **Quim. Nova**, v. 36, n. 8, 2013.

PÉREZ-IBAVE, D. C.; BURCIAGA-FLORES, C. H.; ELIZONDO-RIOJAS, M. Á. Prostate-specific antigen (PSA) as a possible biomarker in non-prostatic cancer: A review. **Cancer Epidemiology**, v. 54, n. March, p. 48–55, 2018.

PEZARO, C.; WOO, H. H.; DAVIS, I. D. Prostate cancer: Measuring PSA. **Internal Medicine Journal**, v. 44, n. 5, p. 433–440, 2014.

PIRES, R. Modelagem Matemática De Perfis De Liberação De Fármacos a Partir De Nanocarregadores. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria**, v. 14, n. 1, p. 99-107, 2013.

PREMRATANACHAI, P.; CHANCHAO, C. Review of the anticancer activities of bee products. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 4, n. 5, p. 337–344, 2014.

QI, F. et al. Recent research and development of PLGA/PLA microspheres/nanoparticles: A review in scientific and industrial aspects. **Front. Chem. Sci. Eng.**, v. 13, n. 1, p. 14-27, 2019.

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

RACHMAWATI, H. et al. Curcumin-loaded PLA nanoparticles: Formulation and physical evaluation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 84, n. 1, p. 191–202, 2016.

RAHAIEE, S. et al. Application of nano/microencapsulated phenolic compounds against cancer. **Adv Colloid and Interface Sci.**, v. 279, n. 102153, 2020.

RAVENNA, L. et al. Distinct phenotypes of human prostate cancer cells associate with different adaptation to hypoxia and pro-inflammatory gene expression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2014.

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **World J Oncol.**, v. 10, n. 2, p. 63–89, 2019.

REDONDO, G. P. **Desenvolvimento, caracterização e estudos de dissolução de microencapsulados poliméricos de liberação controlada de extrato de própolis vermelha obtidos através da técnica de secagem Spray Drying.** Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2018.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIBEIRO, L. N. D. M. et al. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.

RODRIGUES, D. M. et al. The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. **J Chem Ecol**, v. 46, p. 150–162, 1 fev. 2020.

RODRIGUES, D. M. et al. Synthesis, antitumor activity and in silico analyses of amino acid derivatives of artemillin C, drupanin and baccharin from green propolis. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 47, n. July, 2021.

RODRIGUES, J. C. Z. **Ação imunomoduladora da própolis vermelha sobre monócitos humanos e citotóxica sobre células de câncer prostático.** Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2021.

ROY VAN DER MEEL, EINAR SULHEIM, YANG SHI, FABIAN KIESSLING, WILLEM J. M. MULDER, T. L. Smart cancer nanomedicine: Strategic directions to improve translation and exploitation. **Nat Nanotechnol.**, v. 14, n. 11, p. 1007–1017, 2019.

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

SALATIN, S. et al. Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2017.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192–1199, 2016.

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

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.

SANNA, V. et al. Targeted nanoparticles encapsulating (-)-epigallocatechin-3-gallate for prostate cancer prevention and therapy. **Scientific Reports**, v. 7, n. February, p. 1–15, 2017.

SARAVANAKUMAR, K. et al. pH-sensitive release of fungal metabolites from chitosan nanoparticles for effective cytotoxicity in prostate cancer (PC3) cells. **Process Biochemistry**, v. 102, p. 165–172, 2021.

SCIFINDER. Explore. Substances. Substance identifier. Artepillin. 72944-19-5. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 05 de nov. 2021.

SCIFINDER. Explore. Substances. Substance identifier. Baccharin. 107389-85-5. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 05 de nov. 2021.

SCIFINDER. Explore. Substances. Substance identifier. 501-98-4. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 05 de nov. 2021.

SCIFINDER. Explore. Substances. Substance identifier. Formononetin. 485-72-3. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 05 de nov. 2021.

SCIFINDER. Explore. Substances. Substance identifier. Biochanin. 491-80-5. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 05 de nov. 2021.

SCIFINDER. Explore. Substances. Substance identifier. Vestitol. 20879-05-4. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 05 de nov. 2021.

SCIFINDER. Explore. Substances. Substance identifier. 50-21-5. Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>>. Acesso em: 05 de nov. 2021.

SEIBERT, J. B. et al. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. **Food Chemistry**, v. 287, p. 61–67, 2019.

SENTHIL KUMAR, P.; GRACE PAVITHRA, K.; NAUSHAD, M. **Chapter 4 - Characterization techniques for nanomaterials**. In: *Nanomaterials for Solar Cell Applications*. Elsevier. 2019.

SFORCIN, J. M. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytother Res.**, v. 30, p. 894-905, 2016.

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 253-260, 2011.

SHAARANI, S.; HAMID, S. S.; KAUS, N. H. M. The Influence of pluronic F68 and F127 nanocarrier on physicochemical properties, in vitro release, and antiproliferative activity of thymoquinone drug. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 1, p. 12–20, 2017.

SHARMA, D. et al. Formulation and optimization of polymeric nanoparticles for intranasal delivery of lorazepam using Box-Behnken design: In vitro and in vivo evaluation. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 156010, p. 1–14, 2014.

SHITOLE, A. A. et al. LHRH-conjugated, PEGylated, poly-lactide-co-glycolide nanocapsules for targeted delivery of combinational chemotherapeutic drugs Docetaxel and Quercetin for prostate cancer. **Materials Science and Engineering C**, v. 114, 111035, 2020.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer Statistics, 2021. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 1, p. 7–33, 2021.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Sink conditions do not guarantee the absence of saturation effects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 577, 119009, 2020.

SILVA, J. C. et al. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1790–1795, 2012.

SLADEK, S. et al. **Chapter 10 - Nanoparticle Tracking Analysis to Examine the Temperature-Induced Aggregation of Proteins**. In: Protein Self Assembly. Methods in Molecular Biology, v. 2039, p. 131–139. 2019.

SMITH, S. A. et al. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. **Bioconjugate Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 263–272, 2019.

SOBRINHO, P. et al. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia L.*) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 14, n. 4, p. 586–591, 2012.

SOUSA, J. P. B. et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 85-93, 2007.

STABILE, A. et al. Multiparametric MRI for prostate cancer diagnosis: current status and future directions. **Nat. Rev. Urol.**, v. 17, n. 1, p. 41–61, 2020.

STROPE, C. L. et al. High-throughput in-silico prediction of ionization equilibria for pharmacokinetic modeling. **Science of the Total Environment**, v. 615, p. 150–160, 2018.

SU, Y. L. et al. Formation of organosilica nanoparticles with dual functional groups and simultaneous payload entrapment. **Journal of Microencapsulation**, v. 35, n. 4, p. 381–391, 2018.

SUFFREDINI, G.; EAST, J. E.; LEVY, L. M. New applications of nanotechnology for
De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

neuroimaging. **American Journal of Neuroradiology**, v. 35, n. 7, p. 1246–1253, 2014.

SULTANA, S. et al. Stability issues and approaches to stabilised nanoparticles based drug delivery system. **Journal of Drug Targeting**, v. 28, n. 5, p. 468–486, 2020.

SUN, S. et al. Identification and determination of seven phenolic acids in brazilian green propolis by UPLC-ESI-QTOF-MS and HPLC. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1–13, 2019.

SZLISZKA, E. et al. Ethanolic extract of Brazilian green propolis sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 38, n. 4, p. 941–953, 2011.

SZLISZKA, E. et al. Artepillin C (3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid) sensitizes LNCaP prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 3, p. 818–828, 2012.

SZLISZKA, E. et al. The dietary isoflavone biochanin-A sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 31, n. 3, p. 331–342, 2013.

TAO, J.; CHOW, S. F.; ZHENG, Y. Application of flash nanoprecipitation to fabricate poorly water-soluble drug nanoparticles. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 9, n. 1, p. 4–18, 2019.

THERMO SCIENTIFIC. **Nucleic Acid**. Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. 2010.

TOMODA, B. T. et al. **Chapter 3 - Characterization of biopolymer membranes and films: Physicochemical, mechanical, barrier, and biological properties**. In: *Biopolymer Membranes and Films*, p. 67–95. Elsevier. 2020.

VALANCIENE, E. et al. Advances and prospects of phenolic acids production, biorefinery and analysis. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 1–41, 2020.

VARGAS-VILLAGRAN, H. et al. Non-woven membranes electrospun from polylactic acid incorporating silver nanoparticles as biocide. **Materials Research Society Symposium Proceedings**, v. 1376, p. 78–83, 2011.

WANG, G. et al. Genetics and biology of prostate cancer. **Genes and Development**, v. 32, n. 17–18, p. 1105–1140, 2018.

WANG, Y. et al. Manufacturing techniques and surface engineering of polymer based nanoparticles for targeted drug delivery to cancer. **Nanomaterials**, v. 6, n. 26, p. 1–18, 2016.

WATKINS, R. et al. Natural product-based nanomedicine: Recent advances and issues. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6055–6074, 2015.

WICKI, A. et al. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 138–157, 2015.

WILSON, D. R.; GREEN, J. J. **Chapter 3 - Nanoparticle tracking analysis for determination of hydrodynamic diameter, concentration, and zeta-potential of polyplex**
De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

nanoparticles. In: *Methods in Molecular Biology*, v. 1570, p. 31–46. Springer Science+Business Media. 2017.

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.

WRIGHT, M. **Chapter 14 - Nanoparticle tracking analysis for the multiparameter characterization and counting of nanoparticle suspensions.** In: *Methods in Molecular Biology*, v. 906, p. 511–524. Springer Science+Business Media. 2012.

YADAV, K. S.; SAWANT, K. K. Modified nanoprecipitation method for preparation of cytarabine-loaded PLGA nanoparticles. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 3, p. 1456–1465, 2010.

YE, Y. et al. Formononetin-induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation. **Horm Metab Res**, v. 44, p. 263–267, 2012.

YEOMAN, C. J. Y. H. D. D. C. M. S. R. I. M. AND I. K. O. C. Genomic and phenotypic heterogeneity in prostate cancer. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 5, p. 139–148, 2017.

ZAABA, N. F.; JAAFAR, M. A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation. **Polymer Engineering and Science**, v. 60, n. 9, p. 2061–2075, 2020.

ZABAIYOU, N. et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 214–222, 1 out. 2017.

ZABAIYOU, N. et al. Ethanolic extract of Algerian propolis decreases androgen receptor transcriptional activity in cultured LNCaP cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 189, p. 108–115, 2019.

ZHANG, Y. et al. A novel paclitaxel-loaded poly(ϵ -caprolactone)/Ploxamer 188 blend nanoparticle overcoming multidrug resistance for cancer treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 6, p. 2045–2052, 2010.