



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA – REDE NORDESTE DE
BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)

ILZA FERNANDA BARBOZA DUARTE RODRIGUES

**DESENVOLVIMENTO DE NUTRACÊUTICO CONTENDO EXTRATO DE
PRÓPOLIS VERMELHA E NANOPARTÍCULAS/NANOCOMPÓSITOS OBTIDOS
POR GELIFICAÇÃO IÔNICA**

Maceió

2024

ILZA FERNANDA BARBOZA DUARTE RODRIGUES

DESENVOLVIMENTO DE NUTRACÊUTICO CONTENDO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA E NANOPARTÍCULAS/NANOCOMPÓSITOS OBTIDOS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA

Tese apresentada ao Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia com ênfase na área da saúde.

Orientador: Prof^a Dr^a Anielle Christine Almeida Silva

Maceió

2024

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

R696d Rodrigues, Ilza Fernanda Barboza Duarte.

Desenvolvimento de nutracêutico contendo extrato de própolis vermelha e nanopartículas / nanocompósitos obtidos por gelificação iônica / Ilza Fernanda Barboza Duarte Rodrigues. – 2024.
122 f. : il. color.

Orientadora: Anielle Christine Almeida Silva.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2024.

Bibliografia: f. 101-122.

1. Nutracêuticos. 2. Própolis vermelha. 3. Microencapsulação. 4. Nanopartículas. 5. Gelificação iônica. I. Título.

CDU: 615.453.4 : 638.135

ILZA FERNANDA BARBOZA DUARTE RODRIGUES

Desenvolvimento de nutracêutico contendo extrato de própolis vermelha e nanopartículas/nanocompósitos obtidos por geleificação iônica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovado em: 15/08/2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



ANIELLE CHRISTINE ALMEIDA SILVA

Data: 15/08/2024 15:09:23-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Anielle Christine Almeida Silva
Orientadora - Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Documento assinado digitalmente



ANGELINA BOSSI FRAGA

Data: 15/08/2024 17:02:51-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Angelina Bossi Fraga
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Documento assinado digitalmente



IRINALDO DINIZ BASÍLIO JÚNIOR

Data: 16/08/2024 07:12:46-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Irinaldo Diniz Basílio Júnior
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Documento assinado digitalmente



MARCOS VINÍCIUS DA SILVA

Data: 15/08/2024 22:55:27-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

Documento assinado digitalmente



RODRIGO CESAR ROSA

Data: 15/08/2024 17:43:21-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodrigo César Rosa
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

A Deus, aos meus pais, família e todos àqueles
que foram grandes incentivadores e que sempre
acreditaram em meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela saúde que me concedeu, persistência, força e determinação ao longo desta caminhada.

Aos meus pais, Ilson Leão e Maria de Fátima, por terem me educado com sabedoria, esforço e paciência, transmitindo através de pequenos gestos, segurança, apoio e amor. É por vocês que lutaram pela minha vitória que estou aqui, e é para vocês que dedico tudo o que fiz até hoje e ainda farei. Amo vocês mais do que tudo!!

Aos meus irmãos e cunhadas por todo o incentivo, apoio, compreensão e amizade, e por sempre torcerem e acreditarem nesta conquista, se fazendo presentes em todos os momentos.

Ao meu esposo, Davi, por todo amor e carinho, pela paciência diária ao longo desta trajetória, por sempre estar disposto a me ajudar onde estiver e por se fazer sempre presente com alegria, amor e muita diversão.

Ao meu filho, Miguel, por me fazer a mãe mais feliz desse mundo e por me mostrar a cada dia que é preciso desacelerar para viver intensamente.

A minha sogra e meu sogro, Maria Gorete e Ivânio, que sempre recebi todo o apoio e força para finalizar o doutorado, além de todo zelo comigo e com meu filho. Vocês foram fundamentais nessa trajetória.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Anielle Christine Almeida Silva com tanta presteza deu-me a oportunidade de fazer parte da sua equipe, no qual pude realizar este trabalho. Agradeço também pela amizade, paciência, orientação e ensinamentos direcionados nessa jornada.

Ao Prof^o Dr^o Irinaldo Diniz Basílio Júnior, que me acompanha em seu laboratório desde 2014 e deu-me a oportunidade de chegar até aqui.

As alunas do PIBITI, Jéssica, Lívia, Melissa e Kathleen, por me ajudarem no desenvolvimento desse projeto.

Aos meus amigos do LABTCOM e da vida, Valdemir, Carol e Naianny, por toda ajuda no laboratório sempre que precisei, pelos momentos de risadas e de amizade. Vocês fizeram com que os perrengues e os erros do dia a dia se tornassem mais leves.

A todos os colaboradores que fizeram parte desse trabalho e que disponibilizaram um tempo para a realização deste estudo.

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

Os nutracêuticos são alimentos ou parte dos alimentos que possuem benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças. A própolis vermelha é um eficiente nutracêutico, muito utilizada na forma de extrato na terapia humana devido às suas propriedades farmacológicas e tem se mostrado promissor em sistemas nanoestruturados, aumentando significativamente sua eficácia terapêutica. No entanto, é bastante instável a fatores extrínsecos comprometendo a sua atividade funcional, necessitando de alternativas tecnológicas para melhorar a sua conservação, como os métodos de encapsulação, que podem ser empregados a fim de melhorar essa estabilidade. Posto isto, o objetivo deste estudo foi desenvolver nutracêutico em forma de microcápsulas incorporando o extrato de própolis vermelha, juntamente com nanopartículas de ZnO e ZnOAg. Seis formulações foram preparadas (F1 a F6) pelo método de gelificação iônica, em seguida, foram avaliadas a eficiência de encapsulação por flavonóides totais, a dissolução e liberação dos flavonoides e caracterizadas por MEV, TGA e FTIR-ATR. As atividades biológicas foram avaliadas através da atividade antioxidante (DPPH, FRAP, ORAC) e antimicrobiana (*Trichoderma afroharzianum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe caulivora*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*). A eficiência de encapsulação mostrou-se elevada, no qual F4, F5 e F6 apresentaram eficiência de 92,51, 94,12 e 95,92%, respectivamente. As fotomicrografias (MEV) apresentaram superfícies sem rachaduras e características diferentes de acordo com cada formulação. A técnica de encapsulação garantiu a preservação das características químicas dos compostos, conforme observado na análise por FTIR-ATR, bem como uma boa estabilidade térmica para F4 e F5. Na atividade antioxidante, todas as formulações apresentaram diferenças estatísticas, no entanto, F4 e F5 obtiveram os melhores resultados. Todas as formulações exibiram atividade antimicrobiana contra as cepas testadas. Notavelmente, a formulação F3 demonstrou atividade superior contra *S. aureus*, no entanto, as formulações F4, F5 e F6 exibiram efeitos inibitórios significativos no crescimento geral do patógeno. Desta forma, conclui-se que os resultados são promissores e oferecem uma base para ampliar o escopo da pesquisa.

Palavras-chave: Atividade microbiológica. Compostos fenólicos. Beads. Microencapsulação. Nanopartículas.

ABSTRACT

Nutraceuticals are foods or parts of foods that have health benefits, including the prevention and/or treatment of diseases. Red propolis is an efficient nutraceutical, widely used in the form of extract in human therapy due to its pharmacological properties and has shown promise in nanostructured systems, significantly increasing its therapeutic efficacy. However, it is quite unstable to extrinsic factors, compromising its functional activity, requiring technological alternatives to improve its conservation, such as encapsulation methods, which can be used to improve this stability. Therefore, the objective of this study was to develop a nutraceutical in the form of microcapsules incorporating red propolis extract, together with ZnO and ZnOAg nanoparticles. Six formulations (F1 to F6) were prepared by the ionic gelation method, and then the encapsulation efficiency for total flavonoids, dissolution and release of flavonoids were evaluated and characterized by SEM, TGA and FTIR-ATR. The biological activities were evaluated through antioxidant (DPPH, FRAP, ORAC) and antimicrobial (*Trichoderma afroharzianum*, *Fusarium oxysporum*, *Diaporthe caulivora*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) activity. The encapsulation efficiency was high, in which F4, F5 and F6 presented efficiencies of 92.51, 94.12 and 95.92%, respectively. The photomicrographs (SEM) showed surfaces without cracks and different characteristics according to each formulation. The encapsulation technique ensured the preservation of the chemical characteristics of the compounds, as observed in the FTIR-ATR analysis, as well as good thermal stability for F4 and F5. In the antioxidant activity, all formulations presented statistical differences, however, F4 and F5 obtained the best results. All formulations exhibited antimicrobial activity against the tested strains. Notably, formulation F3 demonstrated superior activity against *S. aureus*, however, formulations F4, F5 and F6 exhibited significant inhibitory effects on the overall growth of the pathogen. Thus, it is concluded that the results are promising and offer a basis for expanding the scope of the research.

Keywords: Microbiological activity. Phenolic compounds. Beads. Microencapsulation. Nanoparticles.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2. PROBIÓTICOS NATURAIS E NANOMATERIAIS: UM NOVO ALIMENTO FUNCIONAL21

Figura 1. Tipos de nanopartículas. Nanopartículas inorgânicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanossomos, nanocristais ou pontos quânticos, nanotubos de carbono e dendrímeros31

CAPÍTULO 3: SINERGISMO DE NANOMATERIAIS E PRODUTOS NATURAIS NA REVOLUÇÃO DA MICROENCAPSULAÇÃO TERAPÊUTICA38

Figura 1. Nanomateriais à base de carbono.....43

Figura 2. Tipos de nanopartículas poliméricas.....44

Figura 3. Encapsulamento de vitamina C por lipossomas53

Figura 4. Estrutura química do alginato de sódio56

Figura 5. Esquema de preparação de nanopartículas via gelificação iônica externa57

CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE CÁPSULAS CARREGADAS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PELO MÉTODO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA ...61

Figura 1. Processo de encapsulação por gelificação iônica67

Figura 2. Imagens MEV das amostras A (alginato), B (alginato+ZnO), C (alginato+ZnOAg), D (alginato+EPV), E (alginato+EPV+ZnO) e F (alginato+EPV+ZnOAg)74

Figura 3. Termogramas das microcápsulas. F1 (alginato), F2 (alginato+ZnO), F3 (alginato+ZnOAg), F4 (alginato+EPV), F5 (alginato+EPV+ZnO) e F6 (alginato+EPV+ZnOAg)76

Figura 4. Espectros de FTIR de F1 (alginato), F2 (alginato+ZnO), F3 (alginato+ZnOAg), própolis vermelha (RP) F4 (alginato+EPV), F5 (alginato+EPV+ZnO) e F6 (alginato+EPV+ZnOAg)79

Figura 5. Perfis de dissolução de cápsulas em diferentes dissoluções simulando TGI. Dados para cada ponto representam o ensaio triplicado80

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2. PROBIÓTICOS NATURAIS E NANOMATERIAIS: UM NOVO ALIMENTO FUNCIONAL21

Tabela 1. Principais microorganismos utilizados por suas propriedades probióticas, sob a forma de medicamentos ou adicionados a alimentos26

Tabela 2. Mecanismos de ação imunológicos associados aos probióticos.....28

CAPÍTULO 3: SINERGISMO DE NANOMATERIAIS E PRODUTOS NATURAIS NA REVOLUÇÃO DA MICROENCAPSULAÇÃO TERAPÊUTICA38

Tabela 1. Resumo dos principais nanocarreadores utilizados pelas indústrias farmacêuticas45

CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE CÁPSULAS CARREGADAS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PELO MÉTODO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA ...61

Tabela 1. Formulações de cápsulas selecionadas67

Tabela 2. Conteúdo total de flavonoides nas formulações seguido de sua eficiência de encapsulamento71

Tabela 3. Comparação da atividade antioxidante das formulações pelos métodos DPPH, ORAC e FRAP72

CAPÍTULO 5: EXPLORANDO O POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ESFERAS CARREGADAS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA E NANOCOMPÓSITO AG-ZNO/AGO85

Tabela 1. Avaliação da atividade inibitória contra *Fusarium oxysporum*.89

Tabela 2. Avaliação da atividade inibitória contra *Diaporthe caulivora*92

Tabela 3. Avaliação da atividade inibitória contra *Trichoderma afroharzianum*.....93

Tabela 4. Avaliação da atividade inibitória contra *Trichoderma afroharzianum*.....93

Tabela 5. Comparação qualitativa e quantitativa da inibição do crescimento microbiológico de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.....94

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag – Prata

AgNPs – Nanopartículas de prata
AlCl₃ – Cloreto de alumínio
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR – Refletância Total Atenuada
CDs – Ciclodextrinas
CaCl₂ – Cloreto de cálcio
CIM – Concentração Inibitória Mínima
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
CNTs – Nanotubos de carbono
CS-NPS – Nanopartículas de quitosana
CSNRs-GCREO – nanopartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de raiz de celandina
CNP-GCLEO – nanopartículas de quitosana carregadas com óleo essencial de folha de celandina
DPPH – 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
EPV – Extrato de própolis vermelha
FDA – Food and Drug Administration
FDI – Federation Dentaire Internationale
FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power
FTIR-ATR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier de Reflexão Total Atenuada
GCREO – Óleo essencial de raiz de celandina
GCLEO – Óleo essencial de folha de celandina
Gr – Grafeno
GRAS – Geralmente reconhecido como seguro
MEV – Microscópio Eletrônico de Varredura
MH – Mueller Hinton
NaAlg – Alginato de sódio
Na₂CO₃ – Carbonato de sódio
MRSA – *S. aureus* resistente à meticilina
NLCs – Carreadores lipídicos nanoestruturados
NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas
NPs – Nanopartículas
NSMs – Materiais nanoestruturados
ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity

PGA – Poli (ácido glicólico)
 PLA – Poli (ácido láctico)
 PLG – Poli(lático- co -glicólico)
 PLGA – Poli (ácido láctico-co-glicólico)
 PV – Própolis vermelha
 Pur-CS/TPP-NPs – Nanopartículas de quitosana puerarina oral
 TGA – Análise Termogravimétrica
 TiO₂ – Dióxido de titânio
 TTC – 2,3,5-trifenil tetrazólio
 UV – Ultravioleta
 ZnO – Óxido de zinco
 ZnO-NPs – Nanopartículas de óxido de zinco
 ZnO:Ag-AgO – Nanocompósitos de ZnO dopados com nanocristais de prata e óxido de prata
 αM-Ch/Cr – Alfa mangostina carregadas com quitosana-kappa carragenina

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
INTRODUÇÃO	17
OBJETIVO.....	20

Objetivos geral	20
Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO 2. PROBIÓTICOS NATURAIS E NANOMATERIAIS: UM NOVO ALIMENTO FUNCIONAL (Capítulo publicado – IntechOpen).....	21
RESUMO	22
INTRODUÇÃO	22
PROBIÓTICOS NATURAIS	24
Tipos de probióticos.....	25
Mecanismo de ação.....	27
NANOMATERIAIS	28
TIPOS DE SISTEMAS PARA ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS ..	30
.....	30
Nanopartículas poliméricas.....	31
Nanolipossomas.....	32
Nanopartículas lipídicas sólidas	33
Nanohidrogéis.....	34
Nanoemulsão.....	35
CONCLUSÃO	36
CAPÍTULO 3: SINERGISMO DE NANOMATERIAIS E PRODUTOS NATURAIS NA REVOLUÇÃO DA MICROENCAPSULAÇÃO TERAPÊUTICA (Artigo submetido)	38
.....	38
RESUMO.....	39
INTRODUÇÃO	39
NANOTECNOLOGIA, NANOMATERIAIS, NANOPARTÍCULAS	40
ENCAPSULAMENTO DE NANOMATERIAIS: NANOCARREADORES	44
APLICAÇÕES DE NANOMATERIAIS NA ÁREA FARMACÊUTICA.....	50
TÉCNICAS DE MICROENCAPSULAÇÃO DE NANOMATERIAIS	55
CONCLUSÃO	59
CAPÍTULO 4: DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE CÁPSULAS CARREGADAS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PELO MÉTODO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA ...	61
RESUMO.....	62
INTRODUÇÃO	62
METODOLOGIAS	64

Preparo das formulações.....	66
Eficiência de encapsulação.....	68
Atividade antioxidante	68
Ensaio DPPH.....	68
Ensaio ORAC	68
Ensaio FRAP	69
Teste de dissolução e liberação de flavonoides das cápsulas.....	69
Morfologia (MEV)	70
Análise Termogravimétrica (TGA)	70
Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier de Reflexão Total Atenuada (ATR-FTIR)	70
Análise estatística	70
RESULTADOS	70
Eficiência de encapsulação.....	70
Atividade antioxidante	71
Morfologia.....	74
Análise Termogravimétrica (TGA)	75
Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier de Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR)	77
Teste de dissolução e liberação de flavonoides das cápsulas.....	80
DISCUSSÃO.....	81
CONCLUSÃO.....	84
CAPÍTULO 5: EXPLORANDO O POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ESFERAS CARREGADAS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA E NANOCOMPÓSITO Ag-ZnO/AgO	85
RESUMO.....	86
INTRODUÇÃO	87
METODOLOGIAS	88
Atividade fungistática <i>in vitro</i>	88
Ensaio antimicrobiano pelo método de difusão	89
Ensaio antimicrobiano pelo método CIM	89
Análise estatística	90
RESULTADOS	90
Atividade fungistática <i>in vitro</i>	90
Ensaio antimicrobiano	92

DISCUSSÃO.....	96
CONCLUSÃO	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	98
REFERÊNCIAS.....	101

CAPÍTULO 1

Fundamentação teórica

O interesse do consumidor por um estilo de vida mais saudável tem levado ao desenvolvimento de produtos que atendam às necessidades nutricionais e de saúde e que, ao mesmo tempo, sejam atraentes e com boa aceitação no mercado (Duarte et al., 2021). O termo nutracêutico, nos últimos 10 anos, aparece frequentemente nos meios de comunicação e vem ganhando destaque a cada dia (Salgado, 2017; Duarte et al., 2021).

O nutracêutico, pode ser definido como um alimento, ou parte dele, que irá proporcionar benefícios à saúde. Ele também é apontado como um farmaconutriente, no qual a sua composição pode ser capaz de modificar funções fisiológicas ou metabólicas, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença. Os nutracêuticos podem ser classificados em diversos grupos, vegetal (licopeno), animal (ômega-3), leveduras (*Saccharomyces boulardii*), a depender do planejamento alimentar ou de suas propriedades funcionais, como antioxidante, anti-hipertensivo, antiinflamatório, imunomodulador, entre outros (Alencar; Morais, 2021).

Partindo deste pressuposto, um material natural muito utilizado como alimento funcional é a própolis vermelha, que está sendo cada vez mais procurada e é mundialmente reconhecida como um remédio "natural", no qual a maior parte do seu consumo ocorre na forma de extrato etanólico (Silva; Braz, 2015).

A própolis vermelha tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas diversas propriedades como: antimicrobiana, antiparasitária, antifúngica, antiviral, imunoestimulante, antioxidante, antitumoral, antisséptica, espasmolítica, hepatoprotetora, estrogênica e regenerativa de cartilagem e ossos, através do estímulo na proliferação de condrócitos. (López et al., 2014; Pereira et al., 2015; Duarte et al., 2018).

O seu potencial biológico está diretamente ligado à sua composição química, atribuindo essas atividades principalmente aos isoflavonoides, ácidos fenólicos, gutiferas e terpenos (López et al., 2014; Duarte et al., 2018). A própolis vermelha também está dentre os materiais biológicos capazes de formar nanopartículas metálicas, que, devido a sua composição fenólica, a torna importante na formação dessas nanopartículas por proporcionar a redução de metais e sua estabilização (Barbosa, 2019).

A redução dos materiais para nanoescala leva à novas e interessantes propriedades, bem como, o aumento da razão superfície volume aumentando a sua reatividade. Na indústria farmacêutica, as nanopartículas (NPs) atuam como

biocarreadores de medicamentos e em terapias menos invasivas contra o câncer, por exemplo (Mahato et al., 2019; Sanfelice; Pavinatto; Corrêa, 2022).

Diversos tipos de NPs podem ser encontradas na literatura, tais como as metálicas, semicondutoras, a base de carbono, óxidos metálicos e poliméricas. Dentre os tipos citados, as nanopartículas de óxido metálicas se destacam devido à sua multifuncionalidade, proporcionada por suas características únicas, além de estarem ganhando destaque por possuir atividades antimicrobianas. Pode-se citar como exemplo, os materiais nanoestruturados a base de óxido de zinco (ZnO) e prata (Ag), que vem sendo utilizados em diversas áreas (Moura et al., 2021; Sanfelice; Pavinatto; Corrêa, 2022).

As nanopartículas de óxido de zinco (ZnO-NPs) apresentam propriedades bactericidas, antitumorais e biocompatibilidade *in vivo* e são utilizadas em diversas áreas. Ele é aprovado pela Federation Dentaire Internationale (FDI) e pela ANVISA como um material biocompatível e considerado seguro em baixas concentrações pela Food and Drug Administration (FDA). Na área alimentícia, é utilizado como aditivo alimentar e em embalagens para evitar a proliferação de biofilmes. Na área farmacêutica, é amplamente utilizado na composição de protetores solares e cremes, além de ser empregado no tratamento de águas residuais (Sousa et al., 2014; Morais et al, 2017; Mahamuni-Badiger et al., 2020; Silva, 2022).

Nanopartículas de prata (AgNPs) apresentam aplicações promissoras em diversos campos da ciência e tecnologia. A prata é facilmente moldável e maleável, possui várias propriedades benéficas, tem um alto poder antioxidante quando comparado com outros metais, é uma excelente candidata para uso como um material antimicrobiano, além de possuir uma baixa toxicidade para os seres humanos (Albuquerque, 2017; Carvalho, 2019).

A elaboração de produtos inovadores que contém presença de substâncias bioativas, a exemplo dos compostos fenólicos, é susceptível à degradação pela exposição ao calor, à luz ou ao oxigênio, levando a perdas durante o processamento e armazenamento. Desta forma, alternativas devem ser pensadas para proteger essas substâncias desses danos, sendo a microencapsulação uma alternativa para proteger e aumentar a estabilidade durante o processamento e aplicação tecnológica (Rocha, 2017).

A microencapsulação além de proteger os compostos bioativos contra fatores externos, também, evita sabores e odores desagradáveis, garantindo uma liberação

controlada, permitindo o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado (Comunian; Favaro-Trindade, 2016).

Dentre as diversas técnicas de microencapsulação destaca-se o processo de gelificação iônica, uma técnica utilizada para microencapsulação de compostos sensíveis, dada a sua simplicidade e versatilidade (Benavides et al., 2016), permitindo obter cápsulas de diferentes formas e tamanhos. Este método forma uma rede tridimensional, produzindo microesferas instantaneamente, no qual irá encapsular e proteger os compostos ativos oferecendo a estabilidade desejada (Rocha, 2017).

Com base no exposto, este trabalho tem como objetivo produzir nutracêuticos na forma de microcápsulas contendo extrato de própolis vermelha e compostos nanoparticulados, microencapsulados pelo método de gelificação iônica, avaliando-se as características físico-químicas, estabilidade das microcápsulas produzidas, assim como a realização de ensaios microbiológicos.

OBJETIVO

Objetivo geral

Desenvolver nutracêuticos a partir da encapsulação de nanocristais de óxido de zinco e nanocompósitos de óxido de zinco e prata com própolis vermelha, obtidos

pelo processo de gelificação iônica, realizando suas caracterizações físico-químicas, atividades biológicas.

Objetivos específicos

1. Padronizar as formulações das microcápsulas com EPV e os nanomateriais ZnO e ZnOAg;
2. Obter as microcápsulas por gelificação iônica;
3. Quantificar a eficiência de encapsulação das microcápsulas por flavonoides totais;
4. Avaliar a dissolução das formulações microencapsuladas;
5. Analisar morfologicamente as formulações das microcápsulas por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
6. Caracterizar os microencapsulados por análises termogravimétricas (TGA);
7. Caracterizar os microencapsulados por espectrofotometria de infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR);
8. Quantificar a capacidade antioxidante das microcápsulas;
9. Mensurar a atividade microbiológica dos microencapsulados.

CAPÍTULO 2

Probióticos Naturais e Nanomateriais: Um Novo Alimento Funcional

PROBIÓTICOS NATURAIS E NANOMATERIAIS: UM NOVO ALIMENTO FUNCIONAL

RESUMO

Os probióticos naturais são alimentos funcionais que apresentam diversas propriedades biológicas, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônico degenerativas. A fim de melhorar a estabilidade desses compostos, aumentar o poder encapsulante, retardar a oxidação, aumentar a sua eficácia,

controlar sua liberação e melhorar a biodisponibilidade a sua combinação com nanomateriais é uma ferramenta em potencial na área alimentícia, possibilitando a elaboração de novos produtos com características funcionais e nutracêuticas. Além disso, o estudo de nanomateriais em probióticos naturais é pouco relatado na literatura, sendo uma área de suma importância no desenvolvimento de novos alimentos funcionais. Portanto, neste capítulo será abordado uma revisão do uso de nanomateriais em probióticos naturais visando especificar suas vantagens e metodologias de preparação e caracterização.

Palavras-chave: probióticos naturais, nanomateriais, novos alimentos funcionais, características nutracêuticas, nanobiotecnologia.

INTRODUÇÃO

O interesse do consumidor por um estilo de vida mais saudável tem levado ao desenvolvimento de alimentos que supram necessidades nutritivas, de saúde e que ao mesmo tempo sejam atrativos, saborosos e com boa aceitação no mercado. Os produtos que oferecem efeitos positivos sobre a saúde ou ingredientes com estas características, alegados ou comprovados, são denominados “alimentos funcionais” (Farias et al., 2021).

A relação entre alimentação e saúde é conhecida por ser uma das chaves para a prevenção de doenças e promoção de bem-estar, com isso, as indústrias passaram a enriquecer alimentos com ingredientes específicos, diferenciando-os em relação aos benefícios oferecidos à saúde quando comparados aos alimentos em suas formas tradicionais (Bagchi, 2006; Wildman, 2000; Salgado, 2017).

No presente século a literatura científica reporta os alimentos funcionais como aliados no tratamento da obesidade (Souza et al., 2017), prevenção de doenças cardiovasculares (Farias et al., 2021), balanço de colesterol plasmático e prevenção de câncer (Reis et al., 2017). Dentre os alimentos funcionais a literatura relata os prebióticos (adicionados de fibras não digestíveis), fortificados (com vitaminas, ômega-3), alterados (removendo componentes nocivos) e os probióticos (Bigliardi; Galati, 2013).

De acordo com a Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999, sobre a alegação de propriedade funcional dos alimentos, é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento,

manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 1999). Entre os compostos funcionais mais investigados pela ciência, temos os probióticos, que segundo a RDC nº 241, de 26 de julho de 2018, é definido como microrganismos vivos que, quando administrado em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do indivíduo (BRASIL, 2018; Filho et al., 2020).

A palavra probiótico tem derivação grega no qual significa “em prol da a vida”, esse termo foi introduzido pela primeira vez por Lilly; Stillwel em 1965 para descrever substâncias secretadas por um microorganismo, o qual estimula o crescimento de outro (Silva, 2007; Santos et al., 2008; Raizel et al., 2011). Fuller (1989) definiu probiótico como suplemento composto de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, através do equilíbrio da microbiota intestinal. Por fim, Havennar et al. (1992) complementou descrição de Fuller (1989), chegando a seguinte definição: que probiótico como cultura pura ou composta de microrganismos vivos que fornecidos ao homem ou animais beneficiam ao hospedeiro pelo estímulo das propriedades existentes na microbiota natural (Santos et al., 2011).

Os probióticos após serem ingeridos devem ser capazes de sobreviverem às condições de estresse presentes no trato gastrointestinal, como suco gástrico, presença de sais biliares e enzimas digestivas e manter sua viabilidade e atividade metabólica no intestino para exercerem os efeitos benéficos aos hospedeiros. Quanto aos desafios tecnológicos para a produção industrial de células, estas devem manter-se estáveis e viáveis em níveis satisfatórios durante todo o prazo de validade do produto (Saad, 2006; Araújo, 2007; Badaró et al., 2008).

Partindo deste pressuposto, há um recente e crescente interesse científico em melhorar a estabilidade, biodisponibilidade e a vida de prateleira de produtos com fontes probióticas utilizando a nanotecnologia como técnica de aprimoramento, uma vez que os sistemas nanoestruturados podem ser capazes de controlar a estabilidade, melhorar a solubilidade, biodisponibilidade e controlar a liberação de compostos bioativos (Wang et al., 2012; Abbas et al., 2015; Neves et al., 2015).

A redução dos materiais para nanoescala leva à novas e interessantes propriedades, bem como, o aumento da razão superfície volume aumentando a sua reatividade (Kasemets et al. 2009). Tal característica das nanopartículas atraiu o interesse comercial na fabricação de nano-ingredientes, suplementos e nutracêuticos. Diversos tipos de nanopartículas podem ser encontrados na literatura,

tais como as metálicas, semicondutoras, a base de carbono, óxidos metálicos e poliméricas, podendo ser aplicadas em uma gama de setores, predominantemente cuidados pessoais, cuidados de saúde e cosméticos. Os benefícios da nanotecnologia no setor de alimentos passam por toda a cadeia alimentar, começando da produção ao processamento, transporte, segurança, armazenamento e entrega (Ranjan et al., 2014; Banjare, 2017).

Com base no exposto, abordaremos neste capítulo uma revisão sobre o uso de probióticos naturais e nanomateriais, visando especificar suas vantagens e metodologias de preparação e caracterização.

PROBIÓTICOS NATURAIS

Probióticos podem ser definidos como suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos, ou componentes microbianos que, quando ingeridos em determinado número, apresentam efeito benéfico sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro (Badaró et al., 2008).

Dentre esses benefícios incluem: atividade antimicrobiana; controle de microrganismos patogênicos (Lahtinen et al., 2012); hidrólise da lactose; modulação da constipação; atividade antimutagênica e anticarcinogênica (Denipote et al., 2010; KUMAR et al., 2011); redução do colesterol sanguíneo, melhora do quadro de pacientes com diabetes tipo 2 (resistência à insulina) e obesidade (Aronsson et al., 2010; An et al., 2011; Naito et al., 2011); modulação do sistema imune; melhoria na doença inflamatória do intestino; e supressão de *Helicobacter pylori* infection (Shah, 2000; Myllyluoma et al., 2005; Salminen et al., 2010). Alguns destes benefícios já são bem estabelecidos, como a modulação da constipação e hidrólise da lactose, enquanto outros benefícios têm mostrado resultados promissores em modelos animais, necessitando ainda de mais estudos clínicos (Costa et al., 2013).

Os probióticos podem ser incorporados em uma grande variedade de produtos alimentícios, principalmente em derivados lácteos, como leite, sorvete, iogurte e queijo. Sua aplicação também tem crescido em outros tipos de alimentos, como leite de soja, maionese, patês, carnes, comidas para bebês, confeitaria, doces, bolos e gomas de mascar (Champagne et al., 2015; Garcia- Ceja et al., 2015; Kingwatee et al., 2015 Shaikh, 2018).

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios: o gênero, a origem (que deve ser humana), a estabilidade frente ao ácido estomacal e

aos sais biliares, a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e a atividade metabólica no intestino (Brizuela et al., 2001; Oliveira et al., 2002; Santos et al., 2003)

Para que o microrganismo seja capaz de promover os efeitos benéficos citados é recomendada a ingestão mínima de 10^8 - 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por dia (BRASIL, 2002). Além disso, a concentração mínima de bactérias vivas não deve ser inferior a 10^7 UFC/g de alimento, já que muitas células morrem durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) (Fao/Who, 2002; Farias et al., 2021).

Tipos de probióticos

Os benefícios transmitidos à saúde se dão por linhagens probióticas específicas, e não por espécie ou gênero específicos. E ainda, que cada linhagem está relacionada com um determinado benefício. Desta forma, nenhuma cepa irá fornecer todos os benefícios propostos. Como por exemplo, o *Lactobacillus casei* linhagem Shirota, no qual há evidências que apoiam a visão de que sua administração por via oral é capaz de auxiliar na digestão e absorção dos nutrientes e restabelecer o equilíbrio normal da microbiota intestinal (Cats et al., 2003). Outros fatores relevantes são adição de misturas de culturas probióticas, ao invés de cepas individuais (Chapman; Gibson, 2011), e o número de células viáveis destes microrganismos no produto comercializado.

Em um intestino adulto saudável, a microflora predominante se compõe de microrganismos promotores da saúde (Tab. 1), em sua maioria pertencente aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Souza et al., 2010). Segundo Holzapfel Schillinger (2002), outras bactérias ácido-láticas com propriedades probióticas são: *Ent. faecalis*, *Ent. faecium* e *Sporolactobacillus inulinus*, enquanto os microrganismos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* Nissle, *Propionibacterium freudenreichii* e *Saccharomyces cerevisiae* têm sido citados como microrganismos não lácticos associados a atividades probióticas principalmente para uso farmacêutico ou em animais (Moraes; Colla, 2006; Shah, 2000; Costa et al., 2013).

Tabela 1. Principais microorganismos utilizados por suas propriedades probióticas, sob a forma de medicamentos ou adicionados a alimentos.

Lactobacillus	Bifidobacteria	Outras bactérias	Fungo
<i>Lactobacillus acidophilus</i> sp	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. acidophilus</i> LA-1*	<i>B. lactis</i> Bb-12	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. casei</i> sp.*	<i>B. breve</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	
<i>L. rhamnosus</i> GG*	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>Termophilus</i>	
<i>L. reuteri</i>*	<i>B. longum</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. delbrueckii</i> subs.*			
<i>bulgaricus</i>			
<i>L. plantarum</i> sp			
<i>L. plantarum</i> 299V			
<i>L. fermentum</i> KLD			
<i>L. johnsonii</i>			

*Cepas que têm sido utilizadas na prevenção e tratamento das doenças alérgicas.

Alguns indivíduos podem vivenciar pouco dos efeitos colaterais relacionados à ingestão dos probióticos devido à morte dos patógenos no ambiente intestinal, visto que estes liberam produtos celulares tóxicos, reação chamada de “die-off reaction”. Nesses casos, deve-se persistir no uso dos probióticos para que haja melhora dos sintomas. Percebe-se um aumento discreto na produção de gases, desconforto abdominal e até mesmo diarreia, que se resolve com o tempo (Raizel et al., 2011).

Mecanismo de ação

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (Varavallo et al., 2008; SBRT, 2014). A modulação

direta do sistema imunológico pode ser secundária à indução de citocinas anti-inflamatórias ou pelo aumento da produção de IgA secretora (Souza et al., 2010).

Apesar das evidências científicas quanto aos mecanismos de ação dos probióticos, ainda existe uma carência na literatura sobre as vias bioquímicas e moleculares que expliquem completamente estes efeitos, como por exemplo, o de aumentarem a função da barreira intestinal (Bermudez-Brito et al., 2012).

Tabela 2 - Mecanismos de ação imunológicos associados aos probióticos

	Efeitos documentados em humanos e/ou animais	Possível mecanismo de imunomodulação
Efeitos locais		
Barreira mucosa	Manutenção e reparo na barreira intestinal e junções intercelulares	Permeabilidade reduzida e absorção sistêmica diminuída de alérgenos/antígenos
Enterócitos	Aumento da produção de TGF- β e prostaglandina E2 responsáveis pela promoção de tolerância das células apresentadoras de antígenos	Redução da inflamação local e promoção de tolerância
Receptores de enterócitos (toll-like)	Efeitos anti-inflamatórios dos probióticos mediados pelos receptores toll-like 9	Inibição das respostas alérgicas, tipo Th2: mecanismo ainda não esclarecido
Células apresentadoras de antígenos (células dendríticas)	Aumento da atividade das células dendríticas no intestino	Promoção efeito tolerogênico pelas células dendríticas

Células T auxiliares (ou efetoras)	Aumento da resposta do tipo Th1	Inibição da diferenciação da resposta Th2
Células T regulatórias	Produção de IL-10 e TGF- β associados com tolerância oral. Aumento de TGF- β (Th3)	TGF- β produzida localmente (inclusive pelos enterócitos) promove efeito tolerogênico pelas células dendríticas, IgA local e aumento da atividade das Treg
Células B e anticorpos	Colonização: aumento do tecido linfóide	Promoção de ambiente tolerogênico
Efeitos sistêmicos		
Células T	Aumento da diferenciação Th1	Secundário aos efeitos das células T no trato gastrointestinal
Células B/IgA	Aumento da produção de IgA em outros tecidos (trato respiratório)	Secundário aos efeitos das células B no trato gastrointestinal

*Adaptado de Souza e colaboradores (2010).

NANOMATERIAIS

A eficácia clínica da administração oral de bactérias probióticas ainda é diminuída devido à perda de viabilidade durante a passagem gastrointestinal, resultando em má distribuição intestinal. A tecnologia de microencapsulação utilizando nanomateriais é uma estratégia de sucesso para resolver esse problema, mantendo a viabilidade dos probióticos, melhorando assim sua eficácia após a administração oral (Razavi et al., 2021). Nos últimos anos, a produção de alimentos probióticos e funcionais utilizando a nanotecnologia representa um dos principais desafios atuais (Silva; Orlandelli, 2019).

A nanotecnologia envolve a caracterização, fabricação e/ou manipulação de estruturas, dispositivos ou materiais que tenham pelo menos uma dimensão de cerca de 1-100 nm de comprimento (Cambrussi et al., 2018; Ferreira; Alves; Santos, 2019) e tem-se emergido como uma das áreas científicas mais promissoras de pesquisa, existindo atualmente inúmeras empresas especializadas na fabricação de novas formas de materiais (tamanho nanométrico) com aplicações esperadas na terapêutica médica, diagnósticos, produção de energia, computação molecular e materiais estruturais (Bazana et al., 2015).

A nanotecnologia na área alimentos insere novas oportunidades para a inovação na indústria de alimentos com imensa velocidade. Assim, algumas das aplicações resultam na presença de nanopartículas ou materiais nanoestruturados no alimento. Essa inovação pode ser aplicada nas características de macroescala

nos alimentos, tais como a textura, sabor, outros atributos sensoriais, intensidade de coloração, processabilidade e a estabilidade durante a vida de prateleira, levando assim a um grande número de novos produtos. Além disso, a tecnologia de nanoencapsulamento pode também melhorar a solubilidade em água, a estabilidade térmica e a biodisponibilidade oral de compostos bioativos (HUANG; YU; RU, 2010; McClements et al., 2009; Silva et al., 2012; EZHILARASI et al., 2013).

Um dos maiores focos da nanotecnologia na indústria alimentícia são os sistemas de encapsulamento e liberação controlada de nutrientes. O uso de nanomateriais têm mostrado propriedades aprimoradas para o encapsulamento de probióticos. Devido às suas propriedades físicas e químicas únicas, os materiais encapsulantes nanoestruturados demonstram grande promessa de proteção de microorganismos das condições ácidas do estômago, o aumento da absorção e, portanto, permitem a liberação bem-sucedida de células probióticas aprisionadas no lúmen intestinal com pH natural (Martins et al., 2015; Razavi et al., 2021).

Os nanomateriais mais básicos utilizados são as nanopartículas. Estas podem se apresentar em diferentes formas, como nanopartículas esféricas (três dimensões nanométricas); nanotubos e nanofibras (estruturas alongadas com duas dimensões em escala nanométrica) e nanoplacas (apresentam apenas a espessura nanométrica). Diversos exemplos de nanopartículas são citados na literatura, como as nanoargilas, as nanopartículas de prata (Ag), as de dióxido de titânio (TiO₂) e as de óxido de zinco (ZnO) (Azeredo, 2012; Mihindukulasuriya; Kim, 2014; Banjare, 2017).

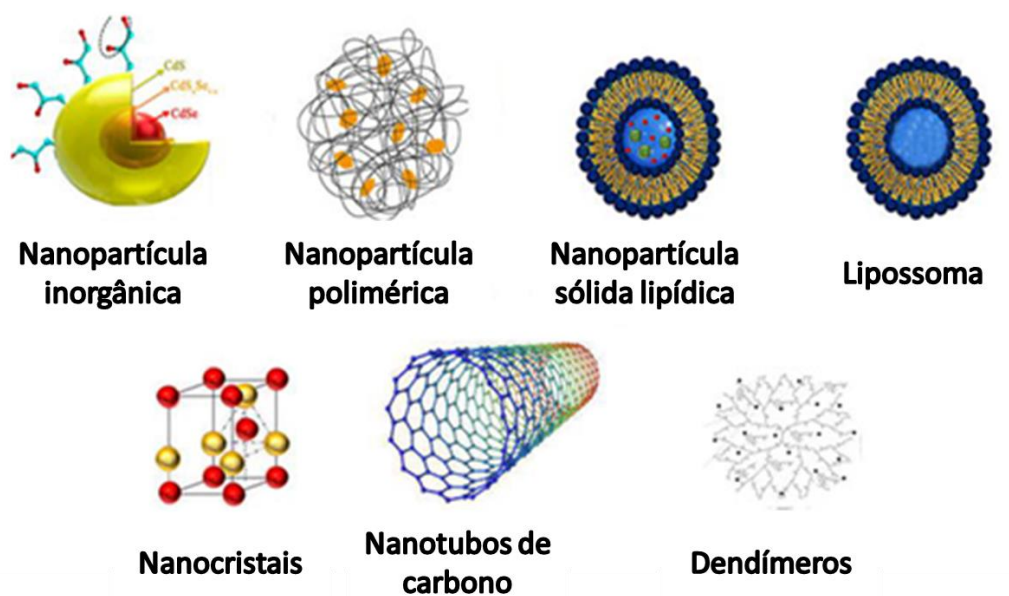
Diferentes tipos de nanoformulações podem ser empregados, cuja preparação exige uma formulação adequada e condições de processamento oportunas. Entre eles, as nanopartículas poliméricas, nanocompósitos, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), os lipossomas e as nanoemulsões são adequadas para aplicações em alimentos (Codevilla et al., 2015; Martins et al., 2015).

TIPOS DE SISTEMAS PARA ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

Nanopartículas (NPs) e materiais nanoestruturados (NSMs) representam uma área ativa de pesquisa com aplicação em vários domínios. Eles são sistemas nanoescalares interessantes devido à facilidade com que podem ser produzidos de diferentes maneiras. NPs e NSMs despertam interesse devido às suas

características físico-químicas ajustáveis, como ponto de fusão, molhabilidade, condutividade elétrica e térmica, atividade catalítica, absorção de luz e dispersão, resultando em melhor desempenho em comparação com suas contrapartes de massa (Jeevanandam et al., 2018). NPs e nanosistemas são amplamente divididos em várias categorias, dependendo de sua morfologia, tamanho e propriedades químicas (Khan; Saeed; Khan 2019). Atualmente, alguns dos sistemas de entrega nanoestruturados mais estudados são nanoemulsões, nanolipossomas, nanohidrogéis, nanopartículas lipídicas e coacervados com aplicação em alimentos (Figura 1).

Figura 1 - Tipos de nanopartículas. Nanopartículas inorgânicas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanossomos, nanocristais ou pontos quânticos, nanotubos de carbono e dendrímeros.



Fonte: Figueira e Santos (2017).

Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são formadas por uma matriz polimérica (nanosferas) ou um sistema de reservatório em que o conteúdo principal é hidrofóbico ou oleoso cercado por uma parede polimérica (nanocápsula) (Barratt,

2000). Estão entre os sistemas de entrega de compostos bioativos mais aceitos e aprovados pelo GRAS (Azevedo et al., 2018). Além disso, ganharam considerável atenção na nanomedicina devido ao potencial de modificação de superfície, controle farmacocinético, adequação para entrega direcionada de terapias (Faraji; Wipf, 2009), propriedades mecânicas (Doshi; Mitragotri, 2009) e flexibilidade de design. Mais especificamente, tamanho, morfologia de superfície, química e carga, porosidade e difusividade do fármaco e eficiência de encapsulamento são propriedades que colocam as nanopartículas poliméricas na vanguarda das aplicações da nanomedicina (Kumari et al., 2010) e podem se comportar de forma semelhante quando incorporadas em alimentos.

As propriedades químicas e de biocompatibilidade das nanopartículas poliméricas têm sido extensivamente estudadas nos últimos anos e permitem que esses sistemas de entrega nanométricos formados por polímeros naturais ou sintéticos sejam úteis na liberação controlada de compostos bioativos naturais, hormônios, genes e medicamentos anticâncer com maior eficácia do que os sistemas micrométricos, como as micropartículas (Lee; Yun; Park, 2016). Devido a uma alta área de contato superficial ocorre uma intensa interação entre a matriz na qual são inseridas e as nanopartículas (Assis et al., 2012).

Atualmente, os polímeros mais utilizados para a formação do sistema nanométrico são o poli (ácido láctico) (PLA), o poli (ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico-co-glicólico) - (PLGA) e a policaprolactona (PCL). As nanopartículas e micropartículas podem ser obtidas por meio de diferentes técnicas que podem ser classificadas em quatro categorias. Categoria 1: método tradicional baseado na formação de uma emulsão composta por emulsão simples, emulsão dupla e emulsões múltiplas, seguida de evaporação do solvente. Categoria 2: métodos baseados em nanoprecipitação, expansão rápida de fluido supercrítico em líquido, salga e diálise. Categoria 3: métodos de composição direta, como técnica de fusão, secagem por pulverização, fluido supercrítico. Categoria 4: novas abordagens, incluindo técnicas microfluídicas e baseadas em molde/molde (Lee; Yun; Park, 2016; Azevedo et al., 2018).

As principais substâncias ativas utilizadas para encapsulamento pelos métodos de obtenção de nanopartículas são substâncias isoladas. Entretanto, alguns autores, como Nascimento et al. (2016) e Azevedo et al. (2018), desenvolveram nanopartículas poliméricas de extrato de própolis vermelha brasileira

contribuindo para o desenvolvimento de tecnologias nanoestruturadas para produtos naturais.

Nanolipossomas

Os nanolipossomas são definidos como vesículas esféricas de bicamada lipídica, assemelham-se à bicamada lipídica das membranas celulares e mantêm bandas nanométricas ou submicrométricas durante o armazenamento e aplicações (Santiago; Castro, 2016; Pathakoti; Manubolu; Hwang, 2017; Khorasani; Danaei; Mozafari, 2018). Sua estrutura de bicamada, formada por metade da bicamada lipídica, contém uma cabeça hidrofílica e uma cadeia acila lipofílica. Assim, sua natureza anfipática permite encapsular compostos hidrofílicos e hidrofóbicos individualmente ou simultaneamente devido às suas propriedades físico-químicas bifuncionais e, conseqüentemente, apresenta interação com uma ampla gama e variedade de moléculas (Zhang et al., 2012). Os nanossistemas são estruturas carreadoras de fármacos com potencial para aplicação na área médica e na indústria alimentícia. No entanto, apresentam baixa robustez quanto à estabilidade física e térmica e às variações de pH, sendo considerados desafios significativos para sua comercialização pretendida (Milani et al., 2019).

O método mais comumente utilizado para a produção de nanolipossomas é a obtenção de uma emulsão dupla seguida de um processo de microfluidização à temperatura ambiente após a remoção prévia do solvente. É possível produzir nanolipossomas utilizando ingredientes naturais de baixo custo (por exemplo, soja, gema de ovo, girassol, leite), otimizando o custo-efetividade do produto final (Khorasani; Danaei; Mozafari, 2018). A literatura relata vários ensaios clínicos utilizando nanolipossomas, e estudos revelam que eles são excelentes candidatos para vários sistemas de distribuição, como medicamentos anticâncer, antifúngicos e antibióticos, administração de medicamentos genéticos e administração de anestésicos e anti-inflamatórios (Allen; Cullis, 2013). Da mesma forma, terá aplicação na área de alimentos, permitindo a incorporação e liberação simultânea de dois ou mais compostos bioativos com solubilidades diferentes, como é o caso dos lipossomas de cadeia média e vitamina C, potencializando a funcionalidade dos alimentos (Santiago; Castro, 2016).

Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas são semelhantes às nanoemulsões em que a fase oleosa foi total ou parcialmente solidificada (McClements, 2011). É um sistema transportador coloidal que permite encapsular, proteger e distribuir componentes lipofílicos funcionais, como lipídios bioativos e fármacos (Assis et al., 2012). O tamanho e a estrutura das nanopartículas lipídicas são semelhantes às nanoemulsões, com um tamanho que geralmente varia de 50 a 1000 nm. O núcleo lipídico nas nanoemulsões é líquido, mas o núcleo lipídico está em estado sólido (Farhang, 2007).

As nanopartículas lipídicas sólidas podem ser classificadas como nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e transportadores lipídicos nanoestruturados (NLCs). Em geral, técnicas de homogeneização de alta pressão fria ou quente e emulsões duplas estão sendo mais usadas atualmente para produzir NLSs e NLCs para encapsular óleos bioativos (Rodríguez et al., 2016). A composição dos NLCs é geralmente lipídios como triglicerídeos (tristearina), glicerídeos parciais (monoestearato de glicerila), ácidos graxos (ácido esteárico), esteróis (colesterol) e ceras (palmitato de cetila) (Assis et al., 2012).

Existe uma grande dificuldade associada aos agentes bioativos lipofílicos em matrizes alimentares na indústria alimentícia, um dos principais problemas para os fabricantes no desenvolvimento de alimentos nutracêuticos e funcionais (Weiss et al., 2008). Assim, NLCs e NLCs visam auxiliar como um carreador de nanopartículas de compostos bioativos com caráter lipofílico. NLCs são matrizes lipídicas nanométricas entre 50 nm e 1 µm de diâmetro, e esses sistemas nanoestruturados são capazes de encapsular efetivamente moléculas ativas e sensíveis que devem ser protegidas de diferentes condições ambientais, como luz, umidade e oxidação. Além disso, a matriz sólida permite uma liberação controlada e uma alta capacidade de atingir o órgão alvo (Rodríguez et al., 2016). NLCs, cuja matriz consiste em uma mistura de lipídios com diferentes propriedades físico-químicas em vez de apenas um tipo de lipídio, foram inicialmente sintetizadas para evitar problemas de NLC com carregamento. Podem formar misturas lipídicas físicas através da mistura de lipídios sólidos e líquidos (óleo), porém sem cristalização, apresentando uma matriz mais desestruturada (entrópica) que permite o controle da carga molecular (Rodríguez et al., 2016; Santiago; Castro, 2012).

Nanohidrogéis

Os nanohidrogéis são definidos como uma rede infinita de polímeros tridimensionais hidrofílicos inchados pela água sem perder sua estrutura porosa interconectada, expandindo-se e desintegrando-se (Artiga-Artigas et al., 2019; Fuciños et al., 2016; Ji et al., 2018). Para aplicação em alimentos, eles devem ser compostos de biopolímeros não tóxicos, biodegradáveis e biocompatíveis para fornecer compostos bioativos em / ou através da mucosa do trato gastrointestinal. Os nanohidrogéis são materiais macios amplamente utilizados pelas indústrias alimentícia e nutracêutica (Ji et al., 2018).

Geralmente, os hidrogéis são formados por polímeros de reticulação química ou física. Eles são basicamente formados por três partes integrais: monômero, iniciador e reticulador (Ahmed, 2015). Diferentes técnicas podem ser adaptadas para obter os nanohidrogéis, como polimerização em massa, solução e suspensão, levando em consideração que as impurezas, incluindo monômero não reagido, iniciadores, reticuladores e produtos indesejados gerados, precisam ser removidos após sua preparação (Artiga-Artigas et al., 2019).

Os nanohidrogéis formados por proteínas biopoliméricas ou polissacarídeos são as melhores alternativas para aplicação em alimentos, pois podem oferecer propriedades funcionais melhoradas em comparação às proteínas nativas. O tamanho, estrutura, carga, permeabilidade, porosidade e estabilidade às condições ambientais e de solução são características essenciais e fundamentais para os nanohidrogéis e dependem em geral das propriedades físico-químicas dos biopolímeros escolhidos para obter o gel (Bourbon et al., 2015). O ajuste adequado dessas variáveis permite que os compostos funcionais sejam carregados e então liberados da matriz polimérica (Cal; Khutoryanskiy, 2015). A escolha do tipo de matriz polimérica deve ser adequada, considerando que os compostos hidrofílicos podem ser liberados de uma matriz proteica por difusão, enquanto os compostos lipofílicos são liberados principalmente pela degradação enzimática da matriz proteica no trato gastrointestinal (Wang et al., 2012; Artiga-Artigas et al., 2019; Bourbon et al., 2015).

Nanoemulsão

A definição de nanoemulsão consiste em uma excelente dispersão composta de uma fase oleosa (triglicerídeos ou hidrocarbonetos) e uma fase aquosa (água ou água com algum eletrólito ou poliol), que se apresenta como gotas esféricas com

diâmetro menor que 100 nm (Assis et al., 2012). As gotículas de nanoemulsão geralmente têm um núcleo de material lipofílico, que pode ser formado por um ou mais componentes não polares. O conteúdo circundante do núcleo é formado pelo material de polaridade oposta (Artiga-Artigas et al., 2019).

Existe uma grande variedade de métodos para fazer nanoemulsão estável. A preparação da nanoemulsão é dividida de acordo com o nível de energia adotado no sistema como o método de alta e baixa energia (Tadros et al., 2004). Os principais métodos usados para obter uma nanoemulsão incluem homogeneizadores de alta pressão e geradores de ultrassom representando o método de alta energia, incluindo a microfluidização (Kentish et al., 2008). Os métodos de emulsificação de baixa energia são econômicos, nos quais nanoemulsões com gotículas minúsculas são preparadas usando baixas quantidades de energia, dos quais se destacam os métodos de emulsificação espontânea, técnica de fase reversa, método de emulsificação de membrana e método de deslocamento de solvente (Borthakur et al., 2016).

As nanoemulsões oferecem uma ampla gama de aplicações devido à sua flexibilidade de composição em diversos campos, incluindo indústrias de alimentos, bebidas e farmacêuticas para armazenamento e entrega de produtos. Atualmente, pode ser usada para encapsular componentes lipofílicos, como vitaminas, substâncias que conferem sabores, cores, conservantes, nutracêuticos e medicamentos. Além disso, pode ser aplicada para conservar alimentos e compostos bioativos, aumentando a biodisponibilidade e o prazo de validade. Outra aplicação essencial voltada para a indústria alimentícia é a possibilidade de mascarar odores e sabores desagradáveis e proteger moléculas bioativas da oxidação e hidrólise pela ação do ar e da água, respectivamente (Borthakur et al., 2016).

CONCLUSÃO

A nanotecnologia é uma potencial nova tecnologia em alimentos, sendo um dos principais recursos para desenvolvimento e inovação. A redução do tamanho de partícula de compostos bioativos pode melhorar a biodisponibilidade, o controle de liberação, o direcionamento da entrega e a solubilidade. A escolha da técnica de preparação para os sistemas nanoestruturados depende das características do composto bioativo, como hidrofílico ou lipofílico, solubilidade, estabilidade e das

propriedades desejadas para o produto, como tamanho de partícula e biodisponibilidade, entre outras. Assim, é possível verificar algumas das técnicas de nanoencapsulação que podem ser utilizadas em compostos bioativos, e muitas características indesejáveis podem ser contornadas com a nanotecnologia.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado por bolsas do CNPq, CAPES, FAPEAL e FAPEMIG.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

CAPÍTULO 3

Sinergismo de nanomateriais e produtos naturais na revolução da microencapsulação terapêutica

SINERGISMO DE NANOMATERIAIS E PRODUTOS NATURAIS NA REVOLUÇÃO DA MICROENCAPSULAÇÃO TERAPÊUTICA

RESUMO

Este capítulo se aprofunda na sinergia transformadora entre nanomateriais e produtos naturais na microencapsulação terapêutica. A convergência de nanomateriais com os atributos terapêuticos inerentes de compostos naturais está remodelando a administração terapêutica, permitindo proteção, liberação controlada e entrega direcionada de agentes dentro do corpo humano. Esta abordagem inovadora tem uma promessa significativa em diversas aplicações médicas, alavancando as vantagens exclusivas da nanotecnologia. Ela anuncia uma nova era de terapias mais eficazes e personalizadas com impactos adversos mínimos, enfatizando o potencial de amplificar os efeitos positivos de produtos naturais na saúde. A precisão e a eficiência inerentes aos nanomateriais oferecem uma vantagem distinta, abrindo caminho para resultados terapêuticos aprimorados e uma compreensão mais profunda da interação intrincada entre nanotecnologia e compostos naturais na busca de soluções de saúde ideais.

Palavras-chave: nanomateriais, microencapsulamento, sinergia, fabricação, aplicações.

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um campo interdisciplinar que integra ciência e tecnologia e tem grande potencial em diversas áreas que podem melhorar a qualidade de vida da sociedade. O setor da saúde foi um dos mais beneficiados no desenvolvimento de produtos nanotecnológicos. Há estudos relacionados à produção de sistemas controlados de fármacos, diagnósticos, tratamentos in vivo, desenvolvimento de

protetores solares e materiais que promovem a regeneração tecidual (Castro et al. 2019; Szczygilewska et al. 2023).

A redução de materiais à nanoescala apresenta novas características físicas, químicas e biológicas, significativamente alteradas devido ao seu tamanho (1–100 nm), levando a propriedades interessantes, como aumento da razão de volume da superfície e aumento de sua reatividade (Selmani et al. 2022). Pesquisas prometem maior precisão na ação farmacológica de fármacos desenvolvidos com nanopartículas (NPs), que podem atravessar barreiras naturais, como a barreira gastrointestinal, para medicamentos orais e a barreira hematoencefálica, para medicamentos destinados ao Sistema Nervoso Central (Apolinário et al. 2020).

Nanopartículas poliméricas, por exemplo, podem interagir com diversos compostos bioativos hidrofílicos e/ou hidrofóbicos e são consideradas transportadores sustentáveis promissores. Além disso, quando comparados com carreadores à base de lipídios e proteínas, os carreadores poliméricos são biocompatíveis, biodegradáveis e não tóxicos (Assadpour e Jafari 2019; Malekjani et al. 2022).

Medicamentos, sejam de origem sintética ou natural, que necessitem de transporte, podem ser microencapsulados com NPs ou fixados em sua superfície e aplicados para transferir substâncias biologicamente ativas, medicamentos, produtos naturais, entre outros (Malik et al. 2023). O processo de microencapsulação, além de proteger o princípio ativo de reações oxidativas, oferece vantagens como a capacidade de controlar a estabilidade e liberação do material ativo de forma controlada, melhorar a solubilidade, a biodisponibilidade, além de poder aumentar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos colaterais adversos (Duarte et al. 2022; Pereira et al. 2018).

As técnicas de microencapsulação utilizando nanomateriais abrem novas oportunidades para produtos de origem natural. Dentre as alternativas que podem ser utilizadas para preservar as características do material vegetal, destacam-se o encapsulamento em lipossomas, nanoemulsões, uso de micro e nano partículas poliméricas, nanocompósitos, etc. Considerando o material encapsulante e o meio em que ocorre a liberação, o bioativo pode ser liberado no local certo e na concentração desejada, além de prolongar a vida útil do produto e preservar as atividades biológicas (Onwulata 2013; Silva et al. 2014; Ganje et al. 2019).

Com base no exposto, a revisão pretende focar nos benefícios proporcionados pela microencapsulação de nanomateriais e produtos naturais no setor da saúde, melhorando as estratégias de tratamento e a qualidade de vida.

NANOTECNOLOGIA, NANOMATERIAIS, NANOPARTÍCULAS

Com base no exposto, a revisão pretende focar nos benefícios proporcionados pela microencapsulação de nanomateriais e produtos naturais no setor da saúde, melhorando as estratégias de tratamento e a qualidade de vida.

As nanopartículas existem na natureza há milhares de anos, no entanto, a história da ciência por trás da nanotecnologia e dos nanomateriais é relativamente curta. O conceito geral de nanoestruturas foi introduzido pela primeira vez em 1959 pelo físico e ganhador do Prêmio Nobel Richard Feynman, no qual a manipulação de objetos em dimensões atômicas foi sugerida, e em 1974, Nario Taniguchi cunhou o termo nanotecnologia para se referir à manipulação de partículas em escala de magnitude 10^{-9} m (Apolinário et al. 2020; Bazana et al. 2015).

O campo da nanotecnologia é amplo e envolve a criação e o uso de sistemas físicos, químicos e biológicos com características estruturais entre átomos ou moléculas individuais em dimensões submicrométricas (Barhoum et al. 2022; Nasrollahzadeh et al. 2019). Fisicamente, o tamanho é reduzido; quimicamente, novas ligações e propriedades químicas emergem; ações biológicas são produzidas em nanoescala, como a ligação e entrega de fármacos em locais específicos (Assadpour e Jafari 2019). Por ser uma área multidisciplinar, vale destacar alguns conceitos básicos relacionados à nanotecnologia para melhor compreensão (Szczyglewska et al. 2023; Apolinário et al. 2020; Ahire et al. 2022; Jeevanandam et al. 2018):

•**Nanoescala:** a faixa de tamanho do material com uma ou mais dimensões entre 1 e 999 nm.

•**Nanomateriais:** um material com uma ou mais dimensões externas ou estruturas internas que podem exibir novas propriedades em comparação ao mesmo material a granel. Eles existem em várias formas, como nanopartículas, fios, tubos e fibras que funcionam como adsorventes e catalisadores em vários processos.

•**Nanopartícula:** uma partícula com pelo menos uma dimensão em nanoescala que tem propriedades que materiais a granel normalmente não têm. Eles podem ser

divididos em nanocápsulas (consistindo de um revestimento polimérico disposto em torno de um núcleo aquoso ou oleoso, com o composto sendo capaz de ser dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica), nanoesferas (são formadas por uma matriz polimérica, onde o composto ativo pode ser retido ou adsorvido na matriz polimérica), nanopartículas lipídicas e como nanocarreadores vesiculares (lipossomos e polymersomas).

- Nanocompósito:** Material composto por duas ou mais substâncias, das quais pelo menos uma possui componentes em nanoescala, como nanopartículas dispersas em material sólido, podendo ser classificadas em três grupos: nanocompósito de matriz cerâmica, nanocompósito de matriz polimérica e nanocompósito de matriz metálica.

- Nanoestruturas:** podem se referir ao arranjo de moléculas, como DNA e RNA, mas também podem ser um termo geral quando não há definição do tipo exato de estrutura, como nanoestruturas formadas a partir da auto-organização de copolímeros em solução aquosa, fenômeno que pode dar origem a vesículas, micelas ou túbulos.

- Nanocarreador:** nanoestruturas utilizadas para encapsular e liberar fármacos, como lipossomos, nanopartículas lipídicas sólidas, nanoemulsões e similares.

- Nanomedicamentos:** formulação final à base de nanocarreadores, que podem ser liofilizados, dispersos em gel ou mesmo aprovados na forma obtida para uso como medicamento.

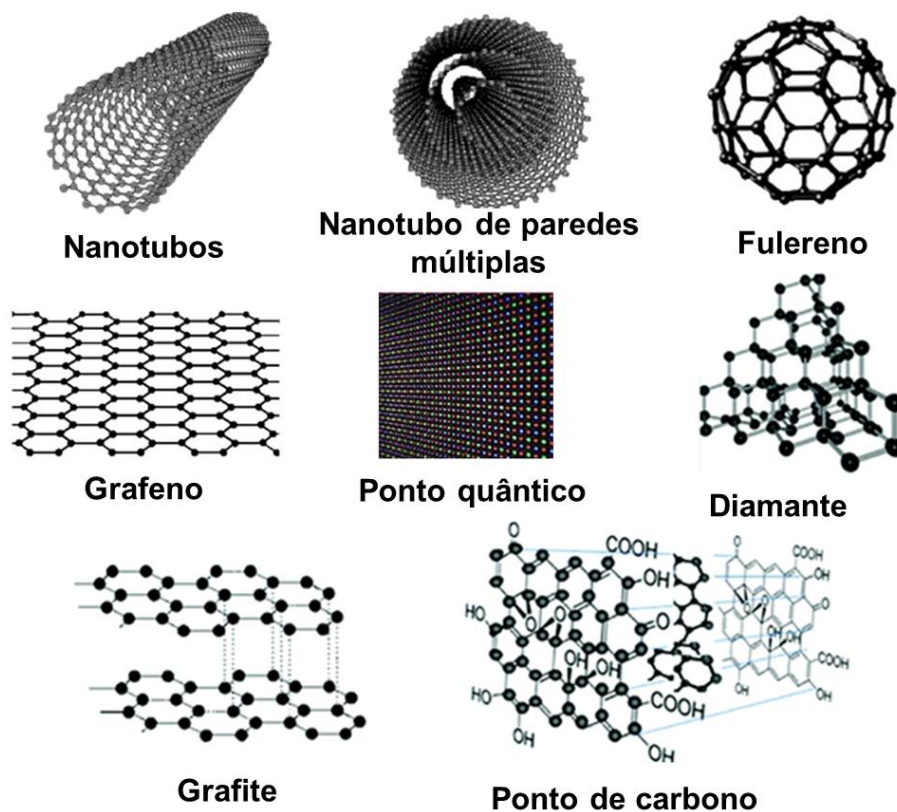
- Materiais nanoestruturados:** materiais contendo nanoestrutura interna ou superficial.

A maioria das nanopartículas pode ser classificada em quatro categorias baseadas em materiais: nanomateriais baseados em carbono (I), nanomateriais baseados em inorgânicos (II), nanomateriais baseados em orgânicos (III) e nanomateriais baseados em compósitos (IV) (Ahire et al. 2022; Jeevanandam et al. 2018).

(I) Nanomateriais à base de carbono: contêm carbono em sua composição e são encontrados em morfologias como tubos ocos, elipsoides ou esferas. Fullerenos (C60), nanotubos de carbono (CNTs), nanofibras de carbono, negro de fumo, grafeno (Gr) e cebolas de carbono. Eles são caracterizados por grande área de

superfície, boa biocompatibilidade, baixa toxicidade e baixos custos de fabricação (Sajid et al. 2020; Khan et al. 2019; Dhakad et al. 2017). Todos os alótropos de carbono são mostrados na Figura 1.

Figura 1 - Nanomateriais à base de carbono.



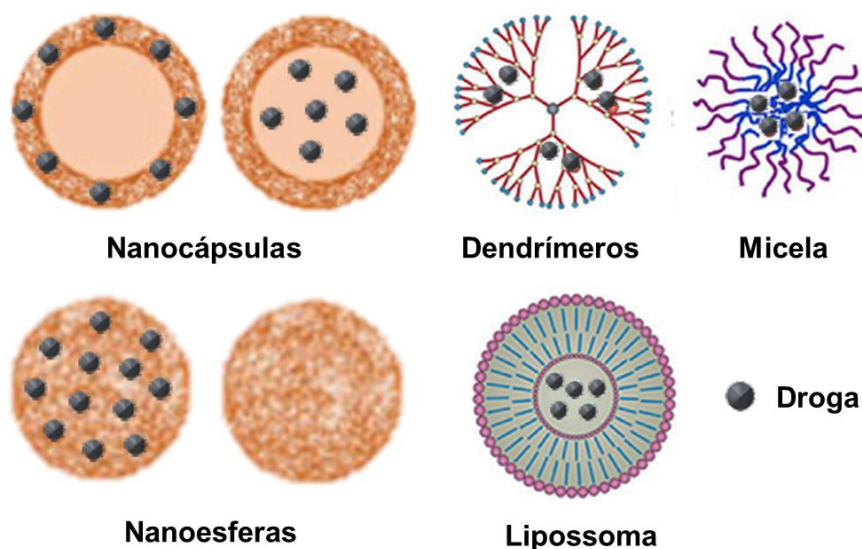
Fonte: Autor, 2024.

(II) Nanomateriais à base de inorgânicos: incluem nanopartículas metálicas, como o nome indica, consistindo apenas de precursores metálicos (Au, Ag, Fe, Zn, Pt e Cu) e óxidos metálicos, que consistem em um precursor metálico combinado com oxigênio (TiO_2 , SiO_2 , Al_2O_3 e ZnO). Eles podem controlar sua composição, tamanho, forma, montagem de estrutura e encapsulamento durante sua síntese, sendo considerados nanoestruturas flexíveis, tendo alta resistência, sendo mais baratos e tendo capacidade de reciclagem (Khan et al. 2019; Asha e Narain 2020; Shnoudeh et al. 2019; Chavali e Nikolova 2019; Sharma et al. 2019).

(III) Nanomateriais de base orgânica: compostos por nanomateriais derivados de matéria orgânica, exceto carbono e derivados de base inorgânica, são compostos por moléculas simples com interações intermoleculares mais fracas (não covalentes), resultando em maior funcionalidade estrutural, reatividade e capacidade de processo. Estas são transformadas em estruturas desejadas, como dendrímeros,

micelas e nanopartículas poliméricas (Figura 2). As nanopartículas poliméricas são geralmente feitas de polímeros naturais biodegradáveis e biocompatíveis e são frequentemente usadas como carreadores de fármacos, nos quais podem ser adsorvidas física ou quimicamente.

Figura 2 - Tipos de nanopartículas poliméricas.



Fonte: Autor, 2024.

(IV) Nanomateriais baseados em compósitos: são nanopartículas e nanomateriais multifásicos com uma fase na dimensão nanoescala que podem se combinar com outras nanopartículas. Podem ser qualquer combinação de nanomateriais baseados em carbono, metais ou orgânicos com materiais a granel metálicos, cerâmicos ou poliméricos. Assim, cada nova combinação resulta em um novo compósito. Esses materiais são amplamente utilizados em aplicações biomédicas (Taylor-Pashow et al. 2010) (os hidrogéis exibem propriedades bioativas adaptáveis na engenharia de tecidos) (Barhoum et al. 2022; Walia et al. 2020), catálise (Díaz et al. 2013; Wang et al. 2020) e imagens terapêuticas e diagnósticas (Vivero-Escoto et al. 2011; Bagheri et al. 2018).

ENCAPSULAMENTO DE NANOMATERIAIS: NANOCARREADORES

Com o surgimento da nanotecnologia, um dos maiores focos da indústria farmacêutica são os sistemas de encapsulamento e liberação controlada de fármacos. O desenvolvimento de técnicas envolvendo processamento e aplicações

de estruturas nanométricas para o encapsulamento de compostos ativos mostra grande promessa para melhorar a estabilidade desses compostos, aumentar o poder de encapsulamento, controlar reações oxidativas, aumentar a eficácia terapêutica, controlar a liberação em ambientes apropriados, reduzir a toxicidade do material ativo, proteger compostos bioativos de valor nutricional e melhorar a biodisponibilidade (Malekjani et al. 2022; Peters et al. 2021; Menezes et al. 2013).

Na técnica de encapsulamento, partículas, gotículas ou moléculas gasosas (núcleo ou ingrediente ativo) são envolvidas por um revestimento ou material encapsulante, cuja escolha correta influencia na eficiência do encapsulamento e na estabilidade da nanopartícula (Silva et al. 2014; Ray et al. 2016). Em especial, para substâncias ativas derivadas de produtos naturais, técnicas de nanoencapsulação podem ser utilizadas para preservar a integridade química e farmacológica da planta, garantindo a constância de sua ação biológica e segurança de uso, além de potencializar seu potencial terapêutico, uma vez que compostos naturais são mais suscetíveis à degradação de seus constituintes, resultando na perda de atividade farmacológica (Servat et al. 2010).

Nanocarreadores são nanoestruturas utilizadas para encapsulamento e liberação de fármacos e compostos bioativos como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e nanoemulsões, entre outros, em que o nanomedicamento, obtido por essa técnica, pode ser liofilizado, disperso em gel ou mesmo aprovado na forma obtida para uso como medicamento, resultando em melhor desempenho terapêutico do produto.

A tabela 1 resume os principais tipos de nanocarreadores mais utilizados (Apolinário et al. 2020; Malekjani et al. 2022).

Tabela 1 - Resumo dos principais nanocarreadores utilizados pelas indústrias farmacêuticas.

Nanoestruturas	Especificações	Benefícios	Desvantagens	Referências
Lipossomas	As vesículas esféricas de bicamada lipídica mantêm bandas	Tem a possibilidade de encapsular agentes	Rápida depuração devido à adsorção	Rattanapak et al. 2012; Daraee et al. 2016;

	nanométricas ou submicrométricas durante o armazenamento e aplicações. Suas estruturas podem ser modificadas com a adição de diferentes componentes: transfersomes (presença de surfactantes), ethosomes (contém 20 a 45% de etanol) transetosomes (contém 20 a 45% de etanol e moléculas de surfactantes)	ou diagnósticos ou terapêuticos e hidrofílicos e hidrofóbicos, interagindo com uma ampla gama e variedade de moléculas e proporcionand o maior transporte de fármacos, além de proteger os agentes encapsulados de processos metabólicos.	proteína, bem como fragilidade osmótica. Além disso, são menos extensivamente capturados pelas células do sistema reticuloendotelial e têm uma tendência de reduzida de liberar o fármaco à medida que ele circula.	Khorasani et al. 2018; Pathakoti et al. 2017; Santiago et al. 2016
Micelas poliméricas	Formada por uma bicamada polimérica, a partir da auto-organização de copolímeros anfifílicos que se autoagregam em ambientes	Matriz adequada para encapsular polissacarídeos.	Elas têm algumas limitações, como o tempo de produção dessas vesículas, que pode levar até um mês.	Apolinário et al. 2017; Wu et al. 2022; Malek Hosseini et al. 2020; Lu et al. 2018

aquosos,
 resultando em
 diferentes
 nanoestruturas.
 Micelas que
 possuem um
 núcleo hidrofóbico
 com uma casca
 hidrofílica,
 tornando-se um
 carreador de
 substâncias
 hidrofóbicas,
 enquanto micelas
 que possuem um
 revestimento
 hidrofílico
 encapsulam e
 estabilizam o
 núcleo hidrofóbico
 da cadeia (em
 soluções aquosas).

Micro	e	São sistemas	Microemulsõe	Nanoemulsões	Janik et al.
nanoemulsões		líquidos que podem	s são	não são	2023;
		se organizar em	termodinamica	termodinamicam	Carvalho et
		sistemas de fases	mente	ente estáveis e,	al. 2017;
		oleosas (ou	estáveis.	portanto, podem	Nastiti et al.
		orgânicas)		sofrer	2017;
		dispersas em uma		separação de	Delmas et al.
		fase aquosa (ou	Nanoemulsõe	fases ao longo	2011

	polar), na presença s geralmente do tempo.	
	de tensoativos. São têm boa	
	genericamente estabilidade	
	chamadas de cinética.	
	emulsões óleo-em-	
	água (o/a) ou o	
	oposto, água-em-	
	óleo (a/o).	
Nanocápsulas	Nanocápsulas são Maior Eles podem Letchford et	
	estruturas que estabilidade, ficar retidos na al. 2007;	
	envolvem o tamanho de pele e não Mora-	
	revestimento da partícula atingir o alvo de Huertas et al.	
	substância ativa reduzido e liberação do 2010	
	(núcleo) com um distribuição de medicamento.	
	material carreador partículas	
	(material de mais estreita.	
	parede,	
	revestimento, fase Útil para	
	externa ou encapsular	
	membrana) e drogas	
	podem ser hidrofóbicas	
	definidas como ou ativas,	
	sistemas núcleo- como filtros de	
	casca. Sistemas de proteção solar.	
	reservatório são	
	considerados.	
Nanoesferas	Nanoesferas são Eles podem Não foi Letchford et	
	estruturas sólidas levar à encontrado na al. 2007;	
	formadas por uma liberação literatura. Mora-	

	densa rede de retardada de polímeros (matriz) medicamentos na qual a presos dentro substância pode da malha ser retida ou polimérica. adsorvida.			Huertas et al. 2010
	Sistemas de matriz são considerados.			
Nanopartículas metálicas	São produzidos a partir de diferentes materiais metálicos. Por exemplo, nanopartículas de prata são amplamente utilizadas como agentes antimicrobianos, nanopartículas de óxido de ferro são aplicadas para bioimagem, biossensores e terapia fototérmica, e nanopartículas de óxido de titânio e óxido de zinco são comumente utilizadas. usadas em produtos como	Eles têm Toxicidade excelentes limitada. propriedades: maior solubilidade e biodisponibilidade, melhor estabilidade e melhor atividade farmacológica, como superar barreiras biológicas.		Verma et al. 2019; Wierzbinski et al. 2018;

formulações

contendo protetor

solar.

Como pode ser observado, existem diversos nanocarreadores descritos na literatura, sendo importante entender como eles podem atuar, levando a uma maior eficácia terapêutica e segurança, uma vez que, dependendo da finalidade determinada, algumas nanoestruturas são mais vantajosas em relação a outras (Apolinário et al. 2020).

APLICAÇÕES DE NANOMATERIAIS NA ÁREA FARMACÊUTICA

Nos últimos 10 anos, os nanomateriais vêm se expandindo e crescendo rapidamente na área da nanotecnologia, especialmente na área da saúde humana. A síntese desses materiais nanoestruturados tem atraído enorme interesse devido às suas propriedades únicas, tornando esses materiais excelentes e indispensáveis em muitas áreas da atividade humana (Szczyglewska et al. 2023).

Com o avanço da nanotecnologia, a qualidade de vida humana tem melhorado a cada dia, com métodos mais avançados de diagnóstico, tratamento de doenças, triagem, sequenciamento, prevenção e ações proativas voltadas à saúde (Assadpour et al. 2019; Vogel et al. 2022). Essa tecnologia já está sendo aplicada em estudos com antimicrobianos (antibacterianos e antivirais), por exemplo, nanomateriais de prata estão sendo usados para curar queimaduras devido à fácil penetração dos nanomateriais no nível celular (Gibney et al. 2021; Comini et al. 2012). Nanotubos de carbono modificados com polietilenoglicol também são nanocarreadores eficientes de moléculas bioativas na administração de medicamentos específicos para o tratamento de doenças infecciosas (Bottini et al. 2011; Sundar et al. 2012).

Alguns nanossensores agem de forma semelhante aos fagócitos para eliminar patógenos tóxicos da corrente sanguínea sem causar choque séptico, especialmente devido à inalação de medicamentos e substâncias proibidas. Eles

também são usados para especificações de dose e para neutralizar casos de overdose (Erkoc et al. 2021; Comini et al. 2012; Jahangirian et al. 2017).

Outra aplicação importante da nanotecnologia é na área de oncologia. Já existem estudos disponíveis de fármacos conjugados com nanopartículas para aumentar a especificidade do fármaco e o direcionamento ao órgão (Aslan et al. 2013; Mazayen et al. 2022; Misra et al. 2010). Também existem estudos que visam reduzir o impacto dos fármacos quimioterápicos, aumentando sua eficiência no direcionamento do tumor e melhorando suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (Nikalje et al. 2015). A aplicação de nanocompósitos como lipossomas, nanoesferas de albumina, micelas e nanopartículas de ouro pode melhorar a permeação e retenção de fármacos anticâncer, utilizando-os como estratégias eficazes de tratamento contra o câncer (Zarogoulidis et al. 2012). Uma eficácia terapêutica melhorada foi observada no tratamento da tuberculose por quimioterapia. Os fármacos rifampicina, isoniazida e pirazinamida foram co-incorporados em nanopartículas de PLG, o que levou a mudanças no comportamento de liberação do fármaco após administração oral. As concentrações terapêuticas desses fármacos no tecido foram mantidas por 10 dias, mas os fármacos livres duraram apenas 1 dia no plasma após a injeção (Gelperina et al. 2005; Pandey et al. 2003).

A doxorrubicina é um medicamento para tratar uma variedade de tipos de câncer, no entanto, é uma substância muito tóxica que afeta não apenas o tecido tumoral, mas também o coração e os rins. O desenvolvimento da doxorrubicina em lipossomas reduziu o transporte de doxorrubicina para o coração e os rins, melhorando sua eficiência terapêutica (Safra et al. 2000).

Na área da nefrologia, as nanopartículas são usadas para tratar distúrbios renais. Triblock, sintetizado usando polímeros anfifílicos, foi usado para fazer nanopartículas de Rhein (derivado de antraquinona) que é usado no tratamento de nefropatia diabética, teve um efeito terapêutico melhorado demonstrando uma melhor distribuição nos rins, bem como um melhor efeito terapêutico (Chen et al. 2018; Brede et al. 2013).

O uso da nanotecnologia também é eficaz para encapsular compostos naturais bioativos. Um estudo realizado por Liu et al. (2018) propôs o desenvolvimento de uma nanopartícula de lipoproteína com um compartimento aquoso interno para transportar nutracêuticos hidrofílicos. Este sistema de entrega

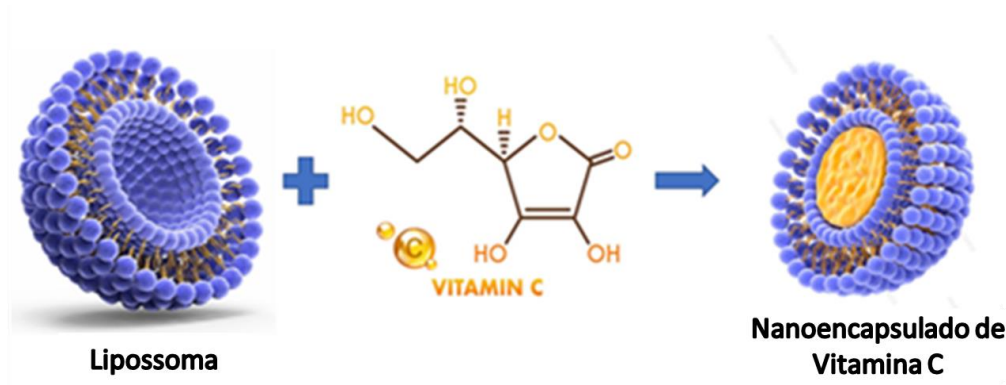
mostrou encapsulamento eficiente de vitamina B12 e um comportamento de liberação controlada em meios gastrointestinais simulados. As avaliações *in vitro* e *in vivo* obtiveram resultados positivos, que demonstraram boa eficiência terapêutica e o estudo de toxicidade em ratos por 14 dias não mostrou evidências tóxicas, o que implica a segurança das nanopartículas desenvolvidas em uso a longo prazo.

Existem vários relatos do desenvolvimento de nutracêuticos usando curcumina e outros compostos naturais para melhorar o desempenho físico (Tirla et al. 2022). Existem estudos que avaliaram o co-encapsulamento de curcumina e resveratrol em nanopartículas lipídicas (Nasr et al. 2016), proteínas (Liu et al. 2018) e polissacarídeos (Guo et al. 2019); outro estudo descobriu que a curcumina e a vitamina D poderiam ser encapsuladas com sucesso em lipossomas (Chaves et al. 2018); curcumina e peptídeos de clara de ovo foram co-encapsulados em partículas biopoliméricas de quitosana e caseína para permitir a administração simultânea (Du et al. 2019); os antioxidantes naturais antocianinas e curcumina foram coencapsulados em micelas de caseína por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, verificando que o coencapsulamento aumentou a estabilidade química e a biodisponibilidade *in vitro* de nutracêuticos (Jiang et al. 2018).

A coenzima Q10 e a piperina foram encapsuladas em nanopartículas biopoliméricas com um núcleo de zeína hidrofóbica e uma casca de carragenina hidrofílica, demonstrando melhor estabilidade química dos dois componentes bioativos (Chen et al. 2020). De acordo com outro estudo, demonstrou-se que um antioxidante carotenoide (astaxantina) coencapsulado com outros antioxidantes naturais (tocotrienóis, capsaicina e resveratrol) pode melhorar a atividade antioxidante sinergicamente (Fukuta et al. 2020).

A vitamina C é uma substância com poder antioxidante com biodisponibilidade limitada (Fenech et al. 2019). Existem estudos de nanoencapsulação desta vitamina em formulações lipossomais (Figura 3) como uma alternativa potencial à administração oral tradicional para aumentar a biodisponibilidade da vitamina C e aumentar seus efeitos terapêuticos. Hickey et al. (2008) e Lukawski et al. (2020) conduziram estudos para comparar a farmacocinética de diferentes doses de vitamina C lipossomal com a vitamina C oral padrão (5 g). De acordo com o estudo, a vitamina C lipossomal gerou níveis sanguíneos mais altos do que a vitamina C oral padrão, mas não tão altos quanto aqueles induzidos pela administração intravenosa.

Figura 3 - Encapsulamento de vitamina C por lipossomas.



Fonte: Autor, 2024.

Estudos realizados por Lin et al. (2016), mostraram melhora na estabilidade físico-química e biodisponibilidade *in vitro* da vitamina D3 em nanocomplexos de vitamina D3 baseados em hidrolisado de proteína de milho. Com este método de nanocomplexação foi possível reduzir as perdas de vitamina D durante o processo, o que implica que a proteína do milho poderia ser usada como uma barreira protetora para transportar suplementos nutricionais hidrofóbicos.

O nutracêutico benzilisotiocianato encapsulado em nanoemulsão tipo O/A, estável à base de α -tocoferol estabilizado com um surfactante não tóxico e biodegradável, apresentou melhor atividade antioxidante do que em nanoemulsões puras e encapsulado em curcumina, entretanto, as curcuminas presas na nanoemulsão foram efetivamente protegidas da luz UV, reduzindo a degradação oxidativa (Kaur et al. 2017).

Micropartículas de etilcelulose com hidroxitirosol encapsulado, constituinte do azeite de oliva com propriedades antioxidantes, demonstraram a eficácia de sua gastrorresistência e capacidade antioxidante com preservação de mais de 50%, indicando possíveis aplicações desta formulação em alimentos, medicamentos e nutracêuticos (Paulo e Santos 2018). A microencapsulação de riboflavina, uma vitamina solúvel em água que atua como cofator em vários processos de oxidação-redução no sistema celular, com biopolímero de galactomanana resultou em sua liberação mais lenta em meios ácidos e básicos em comparação com meios sem vitaminas (De Farias et al. 2018).

A investigação do encapsulamento e preservação da quercetina com ciclodextrinas (CDs), lipossomas convencionais compostos de três tipos diferentes

de fosfolipídios e drugin-CDs-in-lipossomas mostrou que a aplicação de lipossomas resultou em melhor proteção da quercetina contra a irradiação UV, e sua fotoestabilidade foi adicionalmente melhorada quando encapsulada em drug-in-CD-in-lipossomas (complexo de inclusão sulfobutiléter β -CD/Q em lipossomas) (Azzi et al. 2018).

As nanopartículas metálicas também têm várias vantagens na terapia humana. As nanopartículas de ouro têm propriedades de superfície controláveis devido ao seu tamanho e têm vários estudos com potenciais aplicações nas áreas de biossensores, terapia de hipertermia, medicamentos antibacterianos, engenharia genética e plataformas de entrega para produtos terapêuticos (Carnovale et al. 2016; Khan et al. 2014).

As nanopartículas de Cu mostraram potencial atividade antibacteriana contra células de *Escherichia coli* (Harikumar et al. 2016) e toxicidade para células epiteliais basais alveolares adenocarcinômicas humanas (Vijay et al. 2014).

A síntese de nanopartículas de TiO_2 revelou potencial poder larvicida e adulticida contra *Bovicola ovis* (piolho de ovelha) e *Hippobosca maculata* (mosca hematófaga), apresentando propriedades antioxidantes e antibacterianas das nanopartículas de TiO_2 contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* e outros patógenos (Kundu et al. 2002).

Estudos com nanocompósitos de ZnO e AgO dopados com Ag foram avaliados no tratamento de *Leishmania braziliensis* (Barbosa et al. 2022). Os autores produzem três formulações com diferentes porcentagens de nanocristais de óxido de prata (AgO) ($x = 49\%$, 65% e 68%) e descobriram que 65% e 68% de AgO inibem a replicação extra e intracelular desse patógeno, apresentando alta taxa de seletividade. Os nanocompósitos Ag-ZnO/ 65% AgO modulam a ativação, a expressão do receptor de superfície e a produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico humano em direção a um fenótipo pró-inflamatório. Essas descobertas apontam para novos nanocompósitos Ag-ZnO/AgO como uma opção promissora para o tratamento de *L. braziliensis*.

TÉCNICAS DE MICROENCAPSULAÇÃO DE NANOMATERIAIS

Para aumentar o tempo de vida útil desses nanomateriais, as técnicas de microencapsulação surgem como uma possibilidade para essa incorporação,

oferecendo diversas vantagens como facilitar o manuseio, aumentar a estabilidade física, química e biológica, proteger contra reações oxidativas, melhorar a solubilidade, possibilitar o controle da degradação das nanopartículas poliméricas e consequentemente a liberação controlada dos compostos ativos, proporcionando melhor eficácia terapêutica (Karlsen 2020).

A microencapsulação de compostos ativos pode ser realizada por diferentes técnicas: secagem por pulverização, liofilização, emulsificação, extrusão, coacervação, lipossomas, fluidização, complexos de inclusão, cocristalização, polimerização interfacial, gelificação iônica, entre outras (Rajabi et al. 2019; Das et al. 2019). A técnica de gelificação iônica é um método físico-químico que produz esferas ou cápsulas, caracterizadas pela formação de estruturas gelatinosas. Essas estruturas são geralmente esféricas e nanométricas em tamanho, e são o resultado da interação entre as cargas opostas de um polímero e os contra-íons presentes no agente de reticulação (Valle et al. 2021).

Devido à sua natureza não tóxica e à ausência de solventes orgânicos, essa técnica é uma opção de baixo custo em comparação com outras técnicas disponíveis. Além disso, sua simplicidade e independência de temperaturas elevadas ou condições extremas de pH a tornam altamente versátil em várias aplicações. No entanto, é importante controlar os parâmetros de concentração do polímero, a velocidade de agitação e a concentração do agente de reticulação para garantir um encapsulamento eficiente, uma vez que a gelificação iônica depende da interação eletrostática entre o polímero e o agente de reticulação (Takahara et al. 2019; Castlo et al. 2020).

Além disso, um dos principais fatores que influenciarão a estabilidade dos compostos encapsulados é a natureza do material de encapsulamento. Vários polímeros podem ser utilizados no processo de microencapsulação, dentre eles, os polímeros naturais são atrativos devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade (Castlo et al. 2020).

Um polímero muito utilizado para a produção de microcápsulas é o alginato de sódio (Figura 4). Este polissacarídeo pode ser derivado de algas marrons, e além das vantagens apresentadas acima, o alginato possui alta bioadesividade, alta capacidade de absorção de água e baixo custo. Uma das características responsáveis por sua versatilidade é a capacidade de formar estruturas fortemente

reticuladas na presença de íons divalentes, como o cálcio, o que contribui para a obtenção de sistemas de liberação controlada (Martins et al. 2017).

Figura 4 - Estrutura química do alginato de sódio.

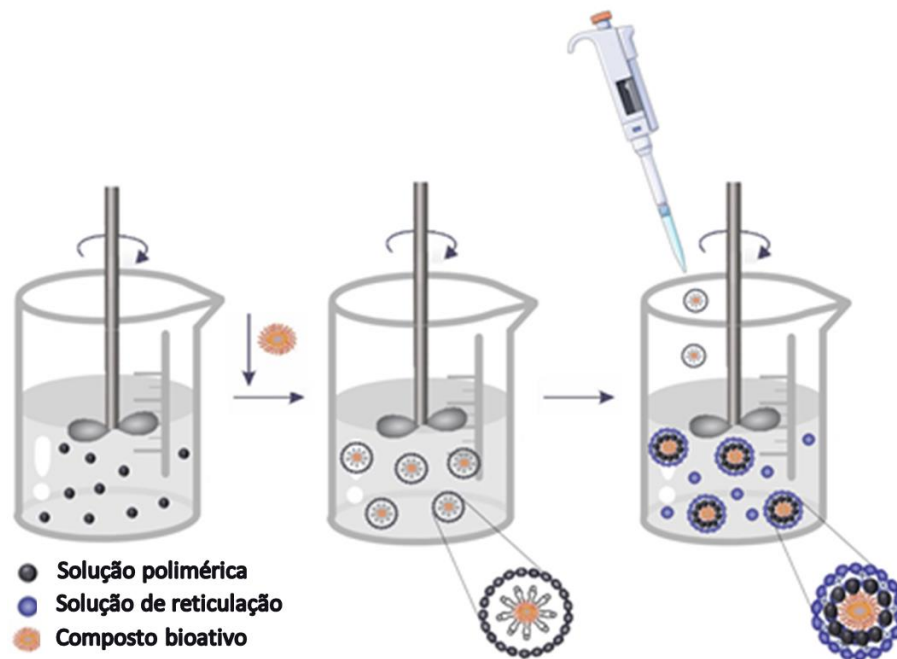


Fonte: Autor, 2024.

A reticulação de cápsulas ou partículas é baseada na capacidade de vários hidrocoloides (como quitosana, alginato, pectinas, gomas, etc.) de gelificarem em meio aquoso na presença de contra-íons (Ca^{2+}). Essa reticulação ocorre devido à interação de íons com os grupos ativos dos polissacarídeos, resultando na formação de géis insolúveis. Essas estruturas sólidas ou semissólidas geralmente adotam um formato esférico, no qual, na presença de um ingrediente ativo, ele pode ser retido dentro da esfera ou adsorvido na superfície (Castlo et al. 2020).

Para melhorar a eficiência e eficácia desse método de encapsulamento, nanopartículas podem ser adicionadas ao processo, gerando nanocompósitos (Figura 5), que auxiliam no transporte de fármacos e moléculas bioativas. O sinergismo das nanopartículas com os sistemas encapsulantes permite otimizar a liberação do fármaco, a biodisponibilidade e reduz a degradação, especialmente de compostos derivados de produtos naturais (Martins et al. 2017).

Figura 5 - Esquema de preparação de nanopartículas via gelificação iônica externa.



Fonte: Autor, 2024.

Além disso, o encapsulamento por gelificação iônica pode ser realizado de duas maneiras: interna e externa. Na gelificação iônica interna, os íons responsáveis pela formação do gel estão presentes dentro das partículas, como micelas ou partículas coloidais. Quando as cargas de íons opostos estão próximas o suficiente, elas se atraem e formam ligações iônicas, o que resulta na formação do gel. Na gelificação iônica externa, os íons responsáveis pela formação do gel são adicionados externamente à solução. À medida que as cargas de íons opostos se aproximam, elas se atraem e formam ligações iônicas, o que resulta na formação do gel (Hoang et al. 2022; Kurozawa et al. 2017).

Estudos Du et al. 2009 de sínteses de nanopartículas de quitosana (CS-NPS) carregadas com vários metais (Ag, Cu, Zn, Mn e Fe), usando o método de gelificação iônica, observou que no teste de atividade antimicrobiana os nanocompósitos puderam inibir *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis* e *Staphylococcus aureus* em baixas concentrações, de 3–85 µg/mL, entre elas, a concentração inibitória mínima de Ag e Cu carregados com CS-NPs de 3–9 e 9–21 µg/mL, respectivamente, com exceção dos nanocompósitos com Fe que não apresentaram atividade. Além disso, outro estudo (Lima et al. 2017) mostrou que Ag carregado com nanopartículas de quitosana pôde inibir *S. aureus*, *E. coli* e *Klebsiella*

pneumoniae com concentrações mínimas de 1,69, 1,69 e 3,38 µg Ag/mL, respectivamente.

Wathoni e colaboradores (Wathoni et al. 2021) avaliaram uma formulação de nanopartículas poliméricas αM baseadas em biopolímero de quitosana e encapsuladas usando carragenina kappa (αM-Ch/Cr) como um novo carreador para terapia de câncer de mama pelo método de gelificação iônica. Estudos de liberação in vitro confirmaram que as nanopartículas αM-Ch/Cr tinham um perfil de sistema de liberação sustentada. Curiosamente, a formulação de nanopartículas poliméricas aumentou significativamente ($p < 0,05$) a citotoxicidade de αM contra células MCF-7 com um valor de IC₅₀ de 4,7 µg/mL em comparação com a não nanopartícula com um IC₅₀ de 8,2 µg/mL. ml. Esses resultados indicam que as nanopartículas αM-Ch/Cr em conjunto com a técnica de gelificação iônica têm o potencial de melhorar as propriedades físico-químicas e os efeitos de citotoxicidade dos compostos αM como agentes terapêuticos para câncer de mama.

Hesami et al. (2022) sintetizaram e caracterizaram CS-NPS carregados com óleo essencial de raiz de celandina (GCREO) e óleo essencial de folha de celandina (GCLEO), obtidos pelo método de gelificação iônica, como um agente anticâncer para atuar de forma biocompatível e sustentável no corpo visando a linhagem celular MCF-7. De acordo com os resultados do MTT, os NPs sintetizados mostraram um efeito dependente da dose na linhagem celular MCF-7. Os valores de concentração inibitória (IC₅₀) para amostras de GCREO, GCLEO, CSNRs-GCREO e CNPs-GCLEO foram 126,4, 90,2, 77,6 e 41,5 µg/mL, respectivamente. A maior taxa de apoptose foi obtida no grupo CNPs-GCLEO (63,73%), revelando que a citotoxicidade de CSNRs-GCREO e CNPs-GCLEO contra a linhagem celular MCF-7 foi significativamente maior do que a de sua forma livre, implicando que o encapsulamento de GCREO e GCLEO em CNPs por gelificação iônica é uma técnica eficiente para melhorar sua atividade anticâncer.

Yan et al. (2020) produziram nanopartículas de quitosana puerarina oral (Pur-CS/TPP-NPs) pelo método de gelificação iônica, avaliando sua cinética. Os resultados farmacocinéticos e o estudo do modelo de perfusão intestinal de passagem única in situ mostram que a biodisponibilidade e a absorção de Pur-CS/TPP-NPs foram significativamente maiores do que a Puerarina. Mostrando que os nanocompósitos preparados podem melhorar significativamente a biodisponibilidade da Puerarina.

Estudos realizados pelo grupo (Rodrigues et al. 2022) produziram diversas formulações de própolis vermelha microencapsulada com nanopartículas de ZnO e Ag-ZnO/AgO utilizando o método de gelificação iônica, utilizando alginato de sódio como agente encapsulante. Os achados deste estudo mostraram que a incorporação de nanopartículas na formulação melhorou a eficiência de encapsulamento da própolis vermelha, aumentando a quantidade de compostos fenólicos e, conseqüentemente, melhorando a atividade antioxidante dessas microencapsulações.

A combinação de alginato e produtos naturais é amplamente estudada na literatura. No entanto, há carência de estudos que abordem a microencapsulação de produtos naturais com alginato associado a nanopartículas utilizando a técnica de gelificação iônica. Desta forma, novos insights podem surgir, valorizando as características físico-químicas e suas aplicações na área da saúde.

CONCLUSÃO

Neste artigo de revisão, buscamos apresentar questões básicas relacionadas ao campo da nanotecnologia e suas inovações tecnológicas para o setor da saúde. Entre elas está o processo de microencapsulação de nanomateriais pelo qual partículas de substâncias ativas são incorporadas em sistemas em escala nanométrica e encapsuladas por hidrocoloides.

O potencial desta técnica e, conseqüentemente, a extensão da linha de produtos nanoencapsulados que podem ser produzidos é inegável, apresentando vantagens na eficácia farmacológica, como aumento da especificidade, redução de efeitos adversos atribuídos ao nanomedicamento e melhor biodisponibilidade, ao permitir a passagem por barreiras biológicas como a cutânea, hematoencefálica e intestinal, bem como sua localização em tecidos tumorais e sítios inflamatórios. Para tanto, é necessário escolher corretamente os materiais de preparação desses sistemas nanoestruturados, o composto ativo e as propriedades desejadas para obter um produto final de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por bolsas do CNPq, CAPES, FAPEAL e RENORBIO.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

CAPÍTULO 4

Desenvolvimento e Avaliação de Cápsulas Carregadas com Extrato de Própolis Vermelha e Nanopartículas Metálicas pelo Método de Gelificação Iônica

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE CÁPSULAS CARREGADAS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA E NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PELO MÉTODO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA

RESUMO

O extrato de própolis vermelha (EPV) é amplamente reconhecido por seu potencial terapêutico em humanos devido à sua alta atividade antioxidante. No entanto, fatores externos como luz, umidade e temperatura podem comprometer a eficácia do EPV, tornando necessárias inovações tecnológicas para melhorar sua estabilidade.

Uma das abordagens inovadoras é o encapsulamento por gelificação iônica, um método econômico e facilmente reproduzível. Neste estudo, um método de gelificação iônica foi usado para desenvolver microcápsulas contendo EPV, juntamente com nanopartículas de ZnO e ZnOAg. Seis formulações foram preparadas e então sua eficácia e atividade antioxidante foram avaliadas. As microcápsulas foram posteriormente caracterizadas usando microscopia eletrônica de varredura, análise térmica e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (FTIR-ATR). Formulações contendo EPV e EPV com nanopartículas de ZnO apresentaram os melhores resultados. A presença de nanopartículas levou a um aumento na concentração de própolis nas formulações, conforme evidenciado pela eficiência de encapsulamento variando de 92% a 95%. Notavelmente, a técnica de encapsulamento garantiu a preservação das características químicas do composto, conforme revelado pela análise FTIR-ATR, bem como boa estabilidade térmica. No geral, a técnica de encapsulamento de gelificação iônica provou ser eficaz e eficiente, encapsulando com sucesso própolis vermelha e nanopartículas, mantendo suas propriedades. Esta abordagem inovadora tem potencial significativo para aumentar a estabilidade e eficácia terapêutica de formulações baseadas em EPV.

Palavras-chave: alginato de sódio, ZnO, encapsulamento, nanopartículas, cápsulas gelatinosas, ZnOAg, flavonoides.

INTRODUÇÃO

O extrato de própolis vermelha (EPV) atraiu atenção global nas indústrias farmacêutica e cosmética. Derivado dos complexos processos naturais de coleta e biotransformação por várias espécies de abelhas, a própolis vermelha (PV) é conhecido por suas diversas atividades biológicas, que estão inerentemente ligadas à sua composição química, incluindo notavelmente isoflavonoides, ácidos fenólicos, gutiferas e terpenos (Duarte et al., 2018; Silva et al., 2020). Apesar de suas propriedades benéficas, o EPV vendido como um extrato alcoólico, muitas vezes possui atributos sensoriais sólidos, como um aroma potente e sabor amargo, tornando-o menos palatável para alguns consumidores e inadequado para mulheres grávidas ou amamentando, crianças e indivíduos com dependência de álcool. Consequentemente, sua aplicação na indústria alimentícia permanece limitada.

As técnicas de encapsulamento surgiram como uma solução altamente eficiente para mitigar esses desafios (Csernaton et al., 2018). Essas técnicas, caracterizadas por seu baixo custo, simplicidade, reprodutibilidade e adaptabilidade para produção em larga escala, oferecem proteção e transporte eficiente de substâncias bioativas, ao mesmo tempo em que garantem estabilidade sob várias condições ambientais (Melo & Constante, 2021).

Numerosos procedimentos de encapsulamento, incluindo secagem por pulverização, revestimento por pulverização, liofilização, emulsificação, extrusão e gelificação iônica, são alternativas viáveis, cada uma com diferentes considerações de custo-benefício (Amin et al., 2016). Além disso, o desenvolvimento de sistemas encapsulados exige atenção a aspectos fundamentais, como a natureza intrínseca e a estabilidade do composto a ser encapsulado, as propriedades do polímero encapsulante e os requisitos específicos do produto desejado, promovendo inovação contínua e avanço tecnológico (Vaniski et al., 2017).

O alginato de sódio (NaAlg), caracterizado por notável biodegradabilidade, biocompatibilidade e ausência de toxicidade, surge como um material de revestimento adequado para processos de encapsulamento (Frent et al., 2022). Amplamente utilizado em formulações farmacêuticas, o NaAlg é fundamental no desenvolvimento de géis para fornecer biomoléculas cruciais como medicamentos, peptídeos e proteínas, ocupando assim uma posição de destaque em pesquisa e desenvolvimento (Flores-Hernández et al., 2021).

Nas últimas duas décadas, a indústria farmacêutica tem integrado cada vez mais nanopartículas (NPs) em formulações para melhorar os aspectos qualitativos e funcionais do produto final. As dimensões em nanoescala oferecem propriedades inovadoras, facilitando o transporte, a cinética, a biodistribuição e a liberação de medicamentos em comparação com as formas convencionais (Duarte et al., 2022).

Nanopartículas metálicas em formulações farmacêuticas, notadamente NPs de óxido de zinco (ZnO), exibem propriedades biológicas aprimoradas, incluindo atividades antioxidantes, antitumorais, bactericidas e leishmanicidas, com várias aplicações no setor da saúde (Sousa et al., 2014; Reis et al., 2015; Souza et al., 2020; Silva et al., 2021; Martins et al., 2021; Valle et al., 2021; Carmo Neto et al., 2022). Aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) como um material biocompatível e seguro em baixas concentrações, o ZnO encontra utilidade na indústria alimentícia como aditivo alimentar e em embalagens para inibir a

proliferação de biofilmes (Sousa et al., 2014; Morais et al., 2017; Mahamuni-Badiger et al., 2020; Garcia et al., 2021).

As nanopartículas de prata (AgNPs) também são promissoras em diversos domínios científicos e tecnológicos. Elas apresentam propriedades favoráveis, como moldabilidade, maleabilidade, alta potência antioxidante, eficácia antimicrobiana e baixa toxicidade humana (Carmo Neto et al., 2022). Estudos recentes de Fonseca et al. (2019), Barbosa et al. (2022) e Moura et al. (2022) destacaram as excelentes propriedades bactericidas, leishmanicidas, antioxidantes e de biocompatibilidade das nanopartículas híbridas Ag-ZnO/AgO. Com base nessa base, o presente estudo investiga as propriedades físico-químicas, térmicas, vibracionais e de estabilidade de cápsulas de EPV associadas a NPs de ZnO-AgO obtidas por meio de gelificação iônica, revelando a preservação das características físico-químicas desses compostos.

METODOLOGIAS

As metodologias foram patenteadas de acordo com os números de processo BR 10 2022 010600 2 e BR 10 2024 005829 1.



**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2022 010600 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2024 005829 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25437484000161

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Avenida Frei Paulino, nº 30, bairro Abadia

Cidade: Uberaba

Estado: MG

CEP: 38025180

País: Brasil

Telefone: 34 33185000

Fax:

Email: nituftm@pesqpg.uftm.edu.br

Preparo das formulações

As cápsulas gelatinosas foram produzidas por meio de experimentos delineados em um plano projetado para desenvolver seis formulações, cada uma contendo concentrações variáveis de alginato de sódio, EPV, ZnO-NPs, ZnOAg-NPs e CaCl₂ (Tabela 1).

As cápsulas esféricas foram preparadas usando o método de gelificação iônica descrito por Suda et al. (2013), no qual o alginato de sódio foi dissolvido em água destilada. A preparação do extrato de própolis vermelha (EPV) envolveu a técnica de maceração a frio, na qual a própolis fresca foi macerada em etanol. Os procedimentos detalhados são patenteados sob o número BR1020220106002.

A síntese de nanopartículas de ZnO e ZnOAg seguiu uma metodologia patenteada documentada sob o número BR10201800771, conforme descrito nos

trabalhos de Barbosa et al. (2022) e Carmo Neto et al. (2022). A solução de reticulação foi preparada dissolvendo cloreto de cálcio em água destilada nas concentrações especificadas na tabela. Então, a mistura foi gradualmente adicionada ao meio de reticulação usando uma seringa.

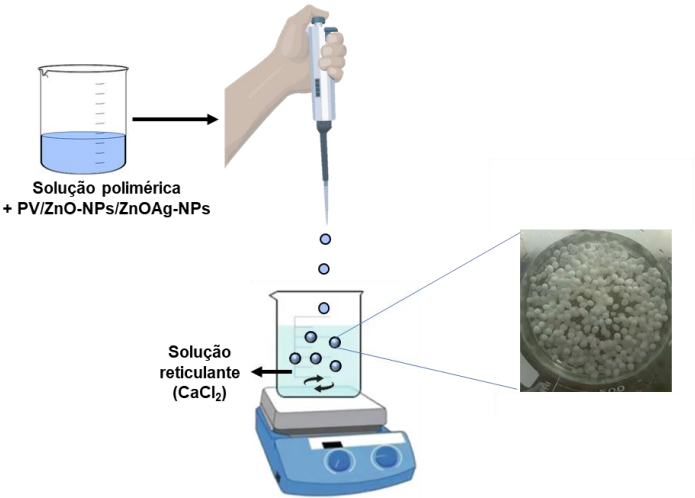
Tabela 1 - Formulações de cápsulas selecionadas.

Formulações	% Alginato de sódio	%EPV	%ZnO-NPs	%ZnOAg-NPs	%CaCl ₂
F1	2	-	-	-	3
F2	2	-	0.4	-	3
F3	2	-	-	0.4	3
F4	2	6.5	-	-	3
F5	2	6.5	0.4	-	3
F6	2	6.5	-	0.4	3

F1= alginato, F2= alginato+ZnO-NPs, F3= alginato+ZnOAg-NPs, F4= alginato+EPV, F5= alginato+EPV+ZnO-NPs e F6= alginato+EPV+ZnOAg-NPs.

As cápsulas se formam em contato imediato com o meio de reticulação (patenteado) e são então coletadas por filtração, armazenadas em recipientes herméticos e refrigeradas para avaliação subsequente (Figura 1). Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata à temperatura ambiente, e os dados são expressos como média ± desvio padrão.

Figura 1 - Processo de encapsulação por gelificação iônica.



Fonte: Autor, 2024.

Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulamento foi avaliada em triplicata com base no conteúdo de flavonoides nas formulações F4, F5 e F6. Para esta análise, uma cápsula de cada formulação foi macerada e dissolvida em 1 mL de etanol, depois filtrada através de uma seringa equipada com um filtro de 0,45 µm (ABLUO SUPREME) para minimizar a interferência do polímero. A análise utilizou o método colorimétrico de cloreto de alumínio (AlCl₃) (Woisky; Salatino, 1998).

O conteúdo total de flavonoides das cápsulas foi determinado a partir de uma curva de calibração (4,0-14 µg/mL) preparada com quercetina (mg mL⁻¹). As seguintes equações foram usadas para calcular a porcentagem total de flavonoides nas amostras analisadas: $C = (Abs - A)/B$ e $\% = (C/M) \times 100$. Onde: % = porcentagem de quercetina; C = concentração de quercetina em µg/mL; Abs = absorbância da amostra; M = Massa da amostra em µg/mL; A = coeficiente linear da equação da reta; B = coeficiente angular da equação da reta.

Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante foi avaliada em todas as formulações usando os métodos DPPH, ORAC e FRAP (Justino et al., 2018) com modificações. Uma cápsula foi diluída em metanol para cada formulação e analisada em triplicata.

Ensaio DPPH

As formulações diluídas em metanol foram incubadas com DPPH (0,06 mmol L⁻¹, metanol) no escuro a 30°C por 20 min. A redução na absorbância da mistura foi medida a 517 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA), com ácido ascórbico e quercetina usados como resultados de controle positivo. A atividade de eliminação do radical DPPH foi calculada usando a seguinte fórmula: Atividade antioxidante (%) = $[(DPPH\ Abs - amostra\ Abs)/DPPH\ Abs] \times 100$, onde Abs DPPH representa a absorção do radical DPPH e Abs amostra denota a absorbância do radical DPPH na presença de própolis/nanocompósitos/controle.

Ensaio ORAC

Todos os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mmol L⁻¹ a pH 7,4 para este procedimento. As formulações foram diluídas em metanol e então incubadas com 0,085 nmol L⁻¹ de fluoresceína à temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, a mistura foi suplementada com APPH (153 mmol L⁻¹) para iniciar a

reação. A intensidade da fluorescência (485 nm/528 nm) foi medida a 37°C por 90 min usando um espectrofotômetro Perkin-Elmer LS 55 (Massachusetts, EUA). A diminuição da intensidade da fluorescência foi determinada pelo cálculo da área sob a curva. A capacidade antioxidante foi avaliada usando uma curva analítica construída com trolox como padrão ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$), enquanto o ácido ascórbico e a quercetina serviram como controles positivos.

Ensaio FRAP

As formulações, previamente diluídas em metanol, foram incubadas a 37°C por 6 min com reagente FRAP consistindo de tampão acetato de sódio (300 mmol L⁻¹, pH 3,6), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (10 mmol L⁻¹) e cloreto férrico (20 mmol L⁻¹) em uma proporção de 10:1:1. A absorbância foi medida a 593 nm usando um espectrofotômetro Molecular Devices (Menlo Park, CA, EUA), e a atividade antioxidante foi determinada usando uma curva analítica construída com trolox como padrão ($\mu\text{mol TE/g}$). Ácido ascórbico e quercetina foram empregados como controles positivos.

Teste de dissolução e liberação de flavonoides de cápsulas

Estudos de dissolução foram conduzidos para determinar o mecanismo de liberação (liberação imediata, controlada, modificada ou gastrorresistente) de flavonoides presentes em cápsulas carregadas com extrato de própolis vermelha (EPV). Com base nos resultados de eficiência de encapsulamento, cápsulas das formulações F4, F5 e F6 foram adicionadas ao meio em uma concentração equivalente a 50 $\mu\text{g/mL}$ de extrato (10, 8 e 6 cápsulas, respectivamente).

Os testes de dissolução foram realizados usando equipamento Agilent, modelo 708-DS (Santa Clara, CA, EUA). A dissolução foi avaliada em dois meios de dissolução diferentes: um meio tampão ácido e outro básico, baseado na Farmacopeia dos EUA com modificações (USP, 2013). As amostras foram coletadas em tempos pré-determinados, e os perfis de liberação foram determinados por espectrofotometria UV-Vis a 280 nm usando um padrão analítico de naringenina para quantificar a liberação de flavonoides. O experimento foi conduzido em triplicado.

Morfologia (MEV)

A caracterização morfológica das cápsulas foi realizada usando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Tescan Vega3). Uma cápsula de cada formulação foi fixada em uma fita adesiva metálica de carbono dupla face e revestida com uma fina camada de ouro usando um metalizador (QUORUM Q150R ES) para facilitar a análise.

Análise Termogravimétrica (TGA)

As propriedades térmicas das formulações foram determinadas por análise termogravimétrica (TGA) usando o equipamento Shimadzu TGA-50®. As amostras foram analisadas em um cadinho de platina sob uma atmosfera de nitrogênio com uma vazão de 50 mL min⁻¹, temperaturas variando de 25 a 600 °C e taxas de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (FTIR-ATR)

As cápsulas foram secas, trituradas e maceradas para obter pó finamente dividido para análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (FTIR-ATR) usando um espectrômetro Cary 660 (Agilent, Califórnia) acoplado a um acessório de refletância total atenuada (ATR). Os espectros foram registrados para identificar grupos funcionais químicos presentes nas formulações.

Análise estatística

Todas as análises foram conduzidas em triplicado com o software estatístico R (v. 4.2.0; R Core Team 2022) e os dados foram apresentados como média ± desvio padrão. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Eficiência de encapsulação

A Tabela 2 apresenta os teores totais de flavonoides e a eficiência de encapsulamento quantificados nas formulações F4, F5 e F6 contendo extrato de própolis vermelha. Os respectivos valores foram determinados como 86,8, 110,6 e 159,5 mg EQ.g⁻¹. Curiosamente, o teor total de flavonoides aumenta com os metais na formulação. Essa observação ocorre devido à adsorção do extrato de própolis

vermelha na superfície das nanopartículas por meio da quimissorção (Henrich, 1985; Sánchez-Sánchez et al., 2024).

Tabela 2 - Conteúdo total de flavonoides nas formulações seguido de sua eficiência de encapsulamento.

Amostra	Flavonoides totais*	Eficiência de encapsulação (%)	Desvio Padrão
F4	86.8 ± 2.23	92.51	0,012
F5	110.6 ± 0.92	94.12	0,006
F6	159.5 ± 0.70	95.92	0,007

*Média ± CV = Coeficiente de variação

1- mg EQ.g⁻¹ Expresso como equivalente de quercetina por g de própolis vermelha.

Atividade antioxidante

A Tabela 3 apresenta os resultados da determinação da capacidade antioxidante das cápsulas obtidas. Os resultados mostram um aumento significativo na atividade antioxidante via atividade de eliminação de radicais livres (DPPH•) observada nas formulações F4 e F5 em comparação às formulações F1, F2 e F3. Esse aumento pode ser atribuído aos compostos fenólicos no extrato de própolis vermelha, particularmente a concentração elevada de flavonoides avaliada anteriormente.

Tabela 3 - Comparação da atividade antioxidante das formulações pelos métodos DPPH, ORAC e FRAP.

Amostra	DPPH % inibição (1 mg/mL de amostra)*	ORAC (µmol trolox eq/g)*	FRAP (µmol trolox eq/g)*
F1	6.9±6.9 ^a	228.3±1.0 ^a	0±0 ^a
F2	12.9±7.8 ^a	456.4±28.9 ^b	0±0 ^a
F3	23.3±5.2 ^a	0±0 ^c	0±0 ^a

F4	61.3±3.4 ^b	800.0±11.2 ^d	0±0 ^a
F5	66.6±3.8 ^b	1872.0±35.1 ^e	9.2±1.6 ^{ab}
F6	5.6±5.6 ^a	1673±49.0 ^f	13.1±4.4 ^b

Legenda: *Letras diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey. F1= Alginato; F2= Alginato+ZnO-NPs; F3= Alginato+ZnOAg-NPs; F4= Alginato+EPV; F5= Alginato+EPV+ZnO-NPs; F6= Alginato+EPV+ZnOAg-NPs.

Comparando F4 com F5, a última formulação experimentou um ligeiro aumento devido à adsorção de própolis vermelha em nanopartículas de ZnO, conforme observado na eficiência de encapsulamento. No entanto, a formulação F6, incorporando própolis vermelha e NPs de ZnOAg, exibiu menor atividade de eliminação de radicais do que todas as outras formulações. Essa diferença pode ser atribuída a interações intermoleculares que estabelecem um sistema estável entre o meio dispersivo, nanopartículas e moléculas orgânicas no EPV, dificultando assim sua atividade antioxidante. Esse obstáculo provavelmente decorre do mecanismo que envolve a transferência de hidrogênio e/ou doação de elétrons para estabilizar o radical DPPH.

A avaliação da capacidade oxidativa usando o método ORAC revelou atividade antioxidante em todas as formulações, exceto para F3. É plausível que o nanocompósito Ag-ZnO/AgO em F3 não exibisse a capacidade de absorver radicais oxigenados usando esse método. Por outro lado, a formulação F6 demonstrou atividade antioxidante notável na presença de extrato de própolis vermelha. As formulações F4 e F5 também apresentaram boa capacidade de absorção de radicais de oxigênio. No entanto, F5 apresentou o resultado mais favorável para atividade antioxidante com o método ORAC, indicando que as nanopartículas de ZnO podem atuar sinergicamente e servir como agentes adjuvantes na formulação, com capacidade de controlar a geração de radicais peroxil. Adicionalmente, por meio deste método, observou-se que a esfera com alginato de sódio (F1) apresentou capacidade oxidativa limitada, que aumentou progressivamente com a adição de nanopartículas de ZnO (F2) e extrato de própolis vermelha (F4). Finalmente, no método de redução do poder antioxidante férrico (FRAP), apenas as amostras F5 e F6 apresentaram atividade crescente entre si, o que pode estar relacionado ao aumento do teor de flavonoides presentes.

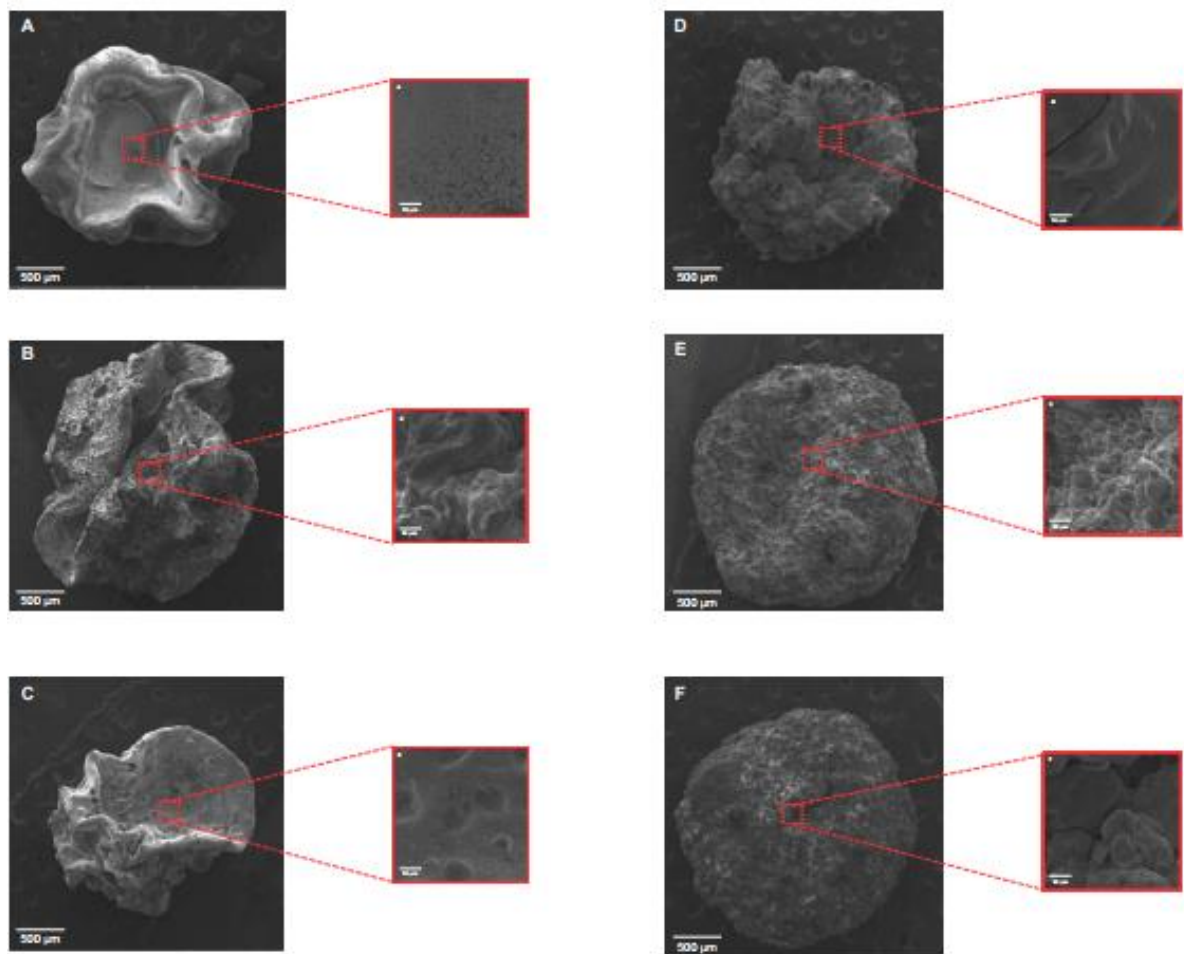
Ao comparar os resultados obtidos por meio de vários métodos, fica evidente que cada método de análise tem suas peculiaridades, incluindo diferentes tipos de

radicais e locais de ação. Isso torna improvável que um único método possa representar de forma abrangente e precisa a verdadeira atividade antioxidante de uma substância. Consequentemente, as propriedades antioxidantes das formulações que contêm própolis vermelha podem advir do seu potencial de transferência de hidrogênio e não da sua capacidade de transferência de elétrons.

Morfologia

As fotomicrografias obtidas por meio de microscópio eletrônico de varredura (MEV) revelaram diferentes características estruturais das cápsulas e suas superfícies (Figura 2). Estas exibiram preservação com possível porosidade e sem evidências de rachaduras.

Figura 2 - Imagens MEV das amostras A (alginato), B (alginato+ZnO), C (alginato+ZnOAg), D (alginato+EPV), E (alginato+EPV+ZnO) e F (alginato+EPV+ZnOAg).



Fonte: Autor, 2024.

As formulações F1 (A), F2 (B), F3 (C) e F4 (D) apresentaram superfícies irregulares, alta rugosidade e aparência de partículas vazias, resultantes do processo de secagem, pois as partículas perdem água, enfraquecendo a estrutura do gel da matriz, fazendo com que as cápsulas encolham e colapsem em suas superfícies. Ao comparar as formulações F1 (A) com F4 (D) quanto ao formato das cápsulas, fica evidente que o extrato de própolis vermelha atuou como material de preenchimento, mantendo um contorno ligeiramente mais esférico. Quanto à superfície, foi observável acúmulo de partículas de EPV em F4, diferentemente de F1, que apresentou superfície mais lisa.

Por outro lado, nas fotomicrografias das formulações F5 (E) e F6 (F), foi observada resistência das cápsulas ao processo de secagem, mantendo formatos próximos a partículas esféricas, superfície granular mais uniforme e sem trincas. Este fenômeno pode ser explicado pelo aumento da concentração do extrato de própolis vermelha na presença de nanopartículas metálicas, que preencheram as

cápsulas, gerando superfícies densas e reduzindo o aparecimento de partículas vazias, fenômeno não observado nas cápsulas F2 e F3, respectivamente, corroborando o teste de eficiência de encapsulamento.

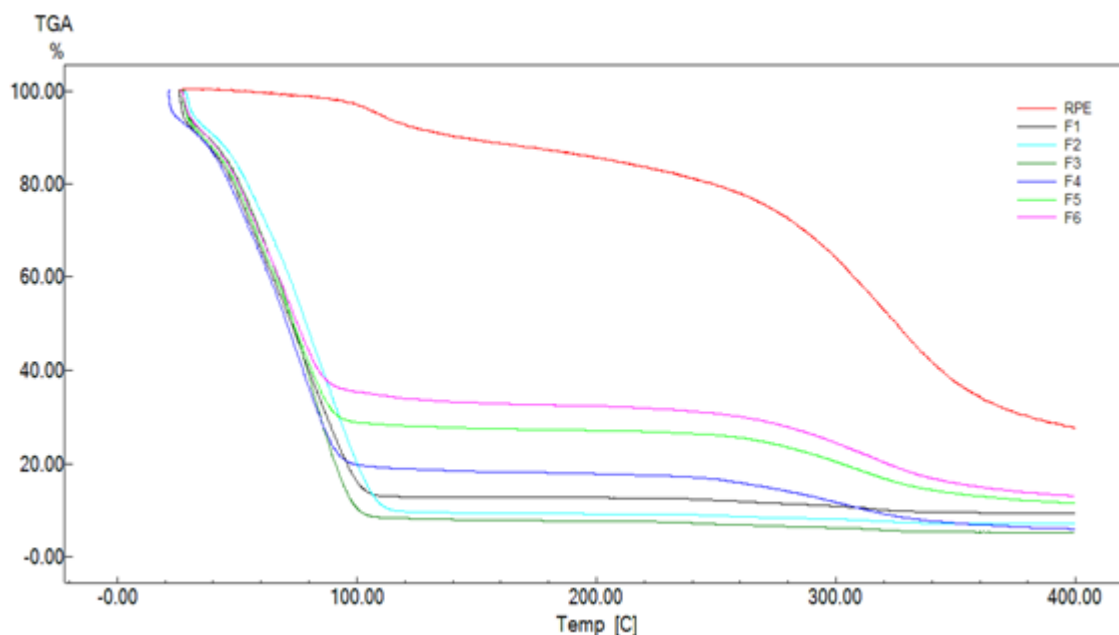
Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 3 mostra os termogramas das microcápsulas. Dois eventos térmicos são discerníveis na curva termogravimétrica do extrato de própolis vermelha (EPV).

O primeiro evento (126,09 °C) pode ser atribuído a monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos, ésteres, álcoois, fenóis, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos com até 10 carbonos. Estes abrangem os compostos voláteis da própolis, responsáveis por seu aroma, e a umidade e volatilização do etanol residual durante a preparação do extrato, resultando em uma perda de massa de 13,32%.

O segundo evento térmico (354,17 °C) corresponde à condensação de grupos -OH, indicativo do processo de fusão de compostos orgânicos de baixo peso molecular, como flavonoides, isoflavonoides e outros compostos fenólicos, resultando em uma perda de massa de aproximadamente 60%.

Figura 3 - Termogramas das microcápsulas. F1 (alginato), F2 (alginato+ZnO), F3 (alginato+ZnOAg), F4 (alginato+EPV), F5 (alginato+EPV+ZnO) e F6 (alginato+EPV+ZnOAg).



Fonte: Autor, 2024.

As curvas termogravimétricas das formulações também exibem dois eventos térmicos. O primeiro evento térmico (Tendset: 99,38/107,07/96,41°C) está associado à perda de água nas formulações, resultando em perdas de massa de 86,29%, 90,38% e 90,74% para as formulações F1, F2 e F3, respectivamente. No segundo evento dessas formulações (Tendset: 338,29/335,55/340,0°C) com uma temperatura final em torno de $\pm 399^{\circ}\text{C}$, as perdas de massa são atribuídas à degradação do alginato, resultando em perdas de massa de 3,31% (F1), 2,40% (F2) e 3,03% (F3).

Consequentemente, nas formulações F4, F5 e F6, o primeiro evento térmico (Tendset: 90,88/88,47/85,39°C) também está relacionado à umidade, com perdas de massa correspondentes a 78,84%, 69,16% e 65,28%, respectivamente. Por fim, o segundo evento dessas formulações (Tendset: 345,20/334,59/352,65°C) apresenta perdas de massa de 12,25%, 16,93% e 21,55%, respectivamente, associadas à degradação do NaAlg por meio de reações de transesterificação intra e intermolecular e cisões de cadeias poliméricas, bem como reações de condensação de hidroxilas referentes a voláteis, ácidos e flavonoides presentes na própolis.

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier de reflexão total atenuada (FTIR-ATR)

O espectro de própolis vermelha (PV) mostra bandas de absorção características dos compostos químicos presentes (Figura 4), refletindo sua

composição química distinta. Várias bandas de absorção correspondentes a diferentes ligações químicas são evidentes.

A banda larga em torno de $3370\text{-}3330\text{ cm}^{-1}$ é característica da ligação O-H, grupos hidroxilados e O-H de álcoois, compostos fenólicos e ácidos carboxílicos no extrato. As bandas em 2954 e 2851 cm^{-1} surgem de vibrações de ligações C-H esticando CH_3 e CH_2 , seguidas por vibrações de dobramento em 1454 e 1372 cm^{-1} . Uma banda proeminente em torno de 1619 cm^{-1} corresponde ao alongamento da ligação de cetonas aromáticas C=, característica de compostos como flavonoides. Alongamentos simétricos na faixa de $1462\text{-}1445\text{ cm}^{-1}$ compreendem a absorção de dobramento de CH_2 .

Uma série de bandas menores com absorções em $1714\text{-}1668\text{ cm}^{-1}$, presença de outros compostos carbonílicos, como ácidos carboxílicos, ésteres e amidas, embora em baixas concentrações. Absorções de intensidade considerável em 1597 , 1505 e 1462 cm^{-1} sugerem fortemente a presença de ligações C=C de compostos aromáticos, incluindo alcenos.

Bandas dentro da faixa de 1287 a 1029 cm^{-1} significam a presença de vibrações de ligação C-O. Uma banda de baixa intensidade em torno de 728 cm^{-1} surge de compostos com porções de hidrocarbonetos em suas estruturas moleculares, como ácidos graxos.

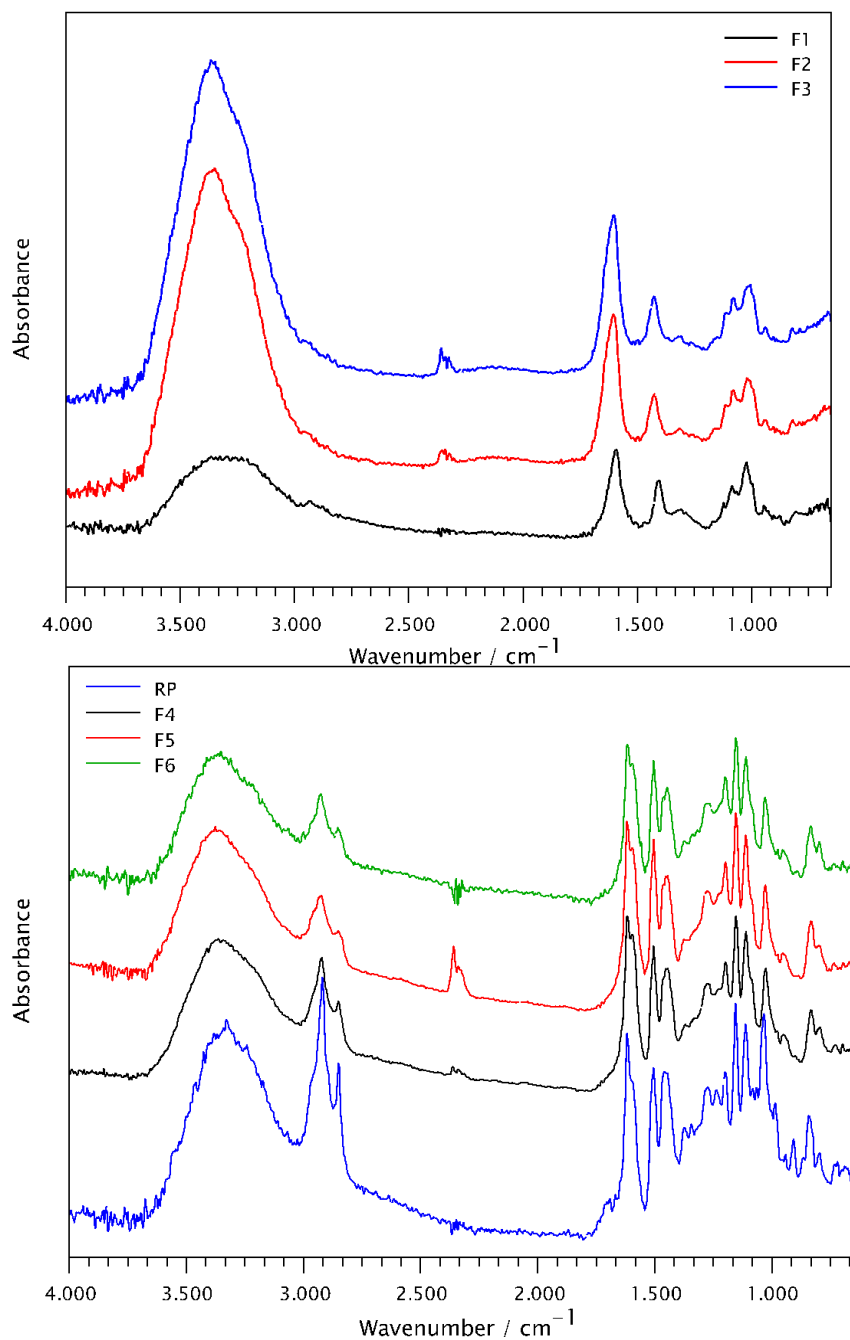
Além disso, absorções mais fracas são observadas devido ao extrato de própolis, natureza complexa, e estão associadas a várias ligações químicas. A própolis vermelha é uma matriz complexa, e compostos em concentrações mais baixas podem resultar em picos espectrais sobrepostos, obscurecendo alguns sinais no espectro. Apesar disso, a técnica se mostra altamente eficaz na caracterização dos materiais em estudo, oferecendo notável resolução na determinação de seus perfis espectrais, representando assim um avanço significativo na análise e identificação de componentes em matrizes complexas.

Em relação às cápsulas F1, F2 e F3, nas quais o alginato é o componente primário, seus espectros FTIR parecem mais diretos, exibindo menos sinais, mas mantendo o mesmo perfil espectral em todas as amostras. A ampla banda O-H característica da cadeia de hidroxilas de alginato é evidente nessas cápsulas, com uma intensidade notavelmente maior observada para F2 e F3. Essa disparidade pode surgir de variações nos níveis de umidade entre elas. Além disso, a absorção em 1594 cm^{-1} surge do alongamento assimétrico do grupo carboxilato de alginato

(COO-) ligação C=O, seguido pelo aparecimento de seu sinal de alongamento simétrico em 1407 cm^{-1} . Notavelmente, devido ao efeito de ressonância da fração carboxilato mais pronunciado, sua absorção ocorre em números de onda mais baixos do que os ácidos carboxílicos correspondentes (forma protonada). Outras bandas se relacionam predominantemente com as vibrações da ligação C-O dentro dos segmentos éter, álcool e carboxilato da estrutura do alginato.

Nos espectros de todas as cápsulas, bandas características de alginato são discerníveis, confirmando sua presença como material de revestimento. Em cápsulas que incorporam extrato de própolis vermelha, absorções originadas de seus constituintes se sobrepõem aos sinais de alginato. Uma comparação entre os espectros das cápsulas F1, F2 e F3 com suas contrapartes contendo própolis vermelha (F4, F5 e F6) revela diferenças distintas em seus perfis espectrais. Os espectros obtidos das três formulações desprovidas de própolis vermelha (F1, F2 e F3) exibem picos idênticos atribuídos aos grupos químicos inerentes à estrutura do alginato; alguns se manifestam nos espectros F4, F5 e F6.

Figura 4 - Espectros de FTIR de F1 (alginato), F2 (alginato+ZnO), F3 (alginato+ZnOAg), própolis vermelha (RP) F4 (alginato+EPV), F5 (alginato+EPV+ZnO) e F6 (alginato+EPV+ZnOAg).



Fonte: Autor, 2024.

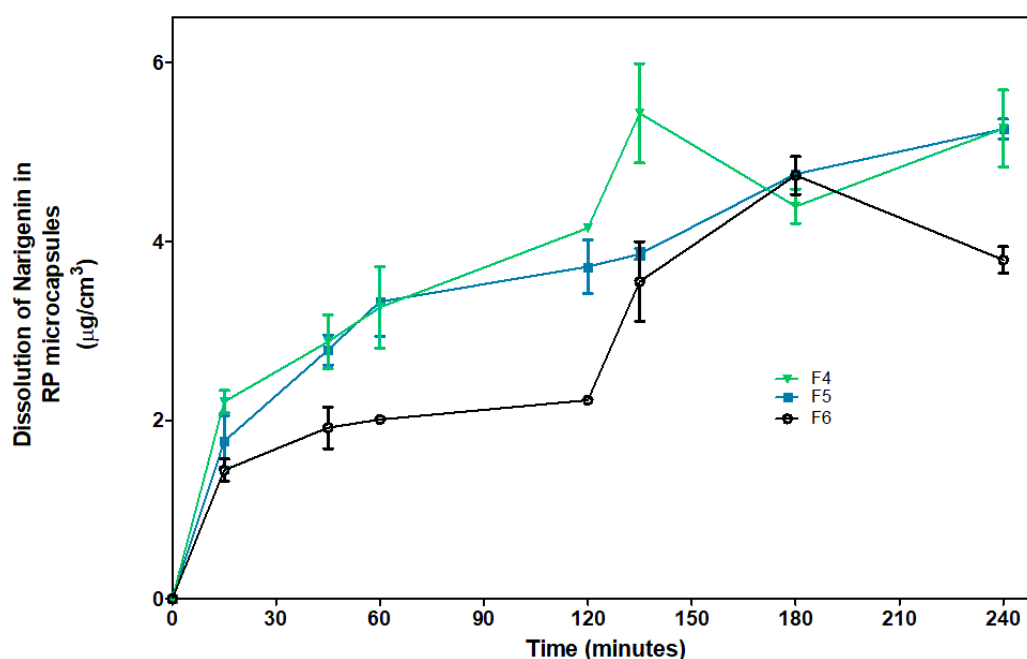
Ao comparar os perfis espectrais de F1 com F4, é evidente que os sinais primários originários do alginato estão presentes em ambos os espectros. Além disso, em F4 os sinais de própolis vermelha são aparentes, confirmando sua presença dentro dessas cápsulas. Uma tendência semelhante é observada ao comparar os espectros F2 com F5 e F3 com F6. Os sinais de carbonila de alginato estão presentes em todas as quatro formulações, enquanto as bandas características da própolis vermelha emergem em F5 e F6, exibindo um perfil

espectral semelhante ao F4. Essas absorções, originárias da própolis vermelha em F4, F5 e F6, abrangem vibrações CH₂ e CH₃, alongamento C=O e C=C e vibrações associadas à ligação C-O, entre outras. Este resultado ressalta a incorporação bem-sucedida da própolis vermelha nas cápsulas F4, F5 e F6, preservando suas propriedades moleculares, mantendo assim as características físico-químicas da própolis.

Teste de dissolução

A Figura 5 exibe os perfis de liberação total de flavonoides em relação à naringenina versus seus respectivos tempos, visando verificar o perfil de dissolução das cápsulas sob investigação.

Figura 5 - Perfis de dissolução de cápsulas em diferentes dissoluções simulando TGI. Dados para cada ponto representam o ensaio triplicado.



Fonte: Autor, 2024.

As cápsulas exibiram um perfil de liberação semelhante em todos os meios de dissolução durante a hora inicial do estudo, indicando baixa cinética de solubilização e um padrão de liberação consistente ao longo de 60 minutos, indicativo de um comportamento de liberação controlada. Notavelmente, a formulação F6 exibiu um

perfil de liberação reduzido em comparação com F4 e F5, provavelmente atribuível à interação entre flavonoides e ZnOAg-NPs.

Após as duas horas iniciais de observação, houve uma escalada notável no perfil de solubilização da formulação devido à transição do meio e ao subsequente aumento do pH. O pH alcalino facilitou a solubilização da esfera, aumentando a solubilização do flavonoide em comparação ao meio ácido. No ambiente alcalino, as formulações F4 e F5 exibiram liberação de flavonoide aprimorada, com a liberação máxima observada em 240 minutos. O comportamento de liberação de F4 e F5 foi notavelmente semelhante, sem variação significativa na quantidade ou taxa de liberação. Isso sugere que EPV (F4) exibiu comportamento de liberação comparável quando cápsulas dentro de nanopartículas de ZnO (ZnO-NPs) na esfera (F5).

Além disso, houve uma tendência geral de aumento da taxa de liberação de naringenina na sequência F6-F4-F5. O exame visual corroborou essas descobertas, pois todas as cápsulas perderam sua forma esférica ao final dos 240 minutos. Esses resultados ressaltam o papel do CaCl_2 como um agente de reticulação, permitindo que as cápsulas obtidas possuam uma propriedade de degradação moderada e, portanto, facilitando a liberação sustentada de flavonoides.

DISCUSSÃO

Demonstramos com sucesso a fabricação de cápsulas contendo extrato de própolis vermelha e nanopartículas de ZnO incorporadas em uma matriz de alginato reticulada por íons de cálcio. As formulações contendo nanopartículas de ZnO apresentaram resultados físico-químicos superiores, apresentando aspectos satisfatórios quanto à qualidade e quantidade dos compostos fenólicos. Este fato observado é devido ao processo de quimissorção da própolis vermelha na superfície das nanopartículas. Esta observação está alinhada com estudos conduzidos por Sánchez-Sánchez et al. (2024), onde conduziram uma análise teórica da interação de CO, CO₂ e NH₃ com ZnO.

Observamos que a eficiência de encapsulamento deste estudo corroborou os resultados dos estudos realizados por Keskin et al. (2019), que encontraram 99,3% de eficiência no encapsulamento de EPV usando o método de gelificação iônica, e Dallabona et al. (2020), que obtiveram eficiência de 89,6% para fenólicos totais e 98,1% para antocianinas monoméricas totais em uma mistura de extrato de jabuticaba e própolis usando o mesmo método de encapsulamento. A sinergia entre

ZnO-NPs e própolis vermelha potencializou as atividades antioxidantes, pois a formulação F5 se mostrou eficiente em todos os meios desta análise.

Por outro lado, a formulação F6, contendo ZnOAg NPs, não obteve resultados satisfatórios usando o método DPPH. Neste método de quantificação, a substância com poder antioxidante elimina o radical DPPH, e a molécula é estabilizada e reage melhor na presença de flavonoides ou ácidos aromáticos grupos -OH (Hamlaoui et al., 2018). Portanto, sugere-se que forças intermoleculares entre os metais na formulação F6 e a própolis vermelha dificultam a liberação de compostos fenólicos responsáveis pela atividade antioxidante.

Para o método FRAP, o mecanismo de ação é redox por meio da doação de elétrons da substância para reduzir Fe^{3+} em Fe^{2+} , promovendo o término de reações de radicais livres. Acredita-se que a presença de dois ou mais grupos -OH nas estruturas fenólicas dos antioxidantes promova atividade antioxidante mais significativa (Grzesik et al., 2018).

Com base no exposto acima, existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante de uma substância. O método escolhido dependerá da natureza dos compostos presentes em sua constituição e do método escolhido, pois eles têm mecanismos de atividade diferentes.

Estudos de dissolução são testes essenciais no desenvolvimento de novas formulações, pois podem ser aplicados para simular condições do trato gastrointestinal (TGI), nas quais composições farmacêuticas ou alimentos sofrem durante a fase de solubilização e subsequente permeação e absorção de moléculas bioativas pelo TGI.

De acordo com Nascimento et al. (2022), o grau de liberação de flavonoides presentes em cápsulas depende de vários fatores, como o grau de solubilidade no meio de dissolução, cargas eletrostáticas, presença de íons no meio de dissolução e também o grau de interação e ligação com os polímeros do material, da parede. Esses autores encontraram perfis de solubilização semelhantes em cápsulas de caseinatos e extrato de própolis vermelha.

Estudos sugerem que bactérias colônicas podem biodegradar compostos fenólicos durante a fase de pré-metabolismo intestinal antes da absorção, reduzindo sua biodisponibilidade in vivo (Bešlo et al., 2023). Neste estudo, foi possível observar que o alginato é um polímero com moderada resistência à degradação em ambiente ácido (simulando o estômago), com o perfil de liberação de um ingrediente

ativo em sua maior concentração em pH alcalino (simulando o cólon). Assim, as cápsulas em estudo apresentaram propriedades de liberação controlada e podem ser aplicadas em produtos farmacêuticos, cápsulas ou alimentos funcionais.

A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou que as formulações contendo própolis vermelha (F4, F5 e F6) mantiveram uma superfície de estrutura morfológica mais definida, compatível com cápsulas.

Também é observada a ausência de trincas ou aberturas nas formulações, o que é essencial para garantir menor permeabilidade aos gases, resultando em maior proteção e retenção do princípio ativo. Fotomicrografias de cápsulas de própolis vermelha obtidas pela mesma técnica de encapsulamento avaliada em outro estudo (Keskin et al., 2019) apresentaram as mesmas características.

Sobre a análise térmica, a TGA, método utilizado para mensurar alterações na massa da amostra em função da temperatura e do tempo aplicado principalmente para avaliar a estabilidade e decomposição térmica de um dado composto, demonstrou que todas as formulações mantiveram excelente estabilidade em altas temperaturas.

Segundo estudos (Flores-Hernández et al., 2021), a decomposição térmica das cápsulas de alginato ocorre em três etapas. O primeiro evento se refere à evaporação da água, o segundo está associado à destruição de ligações glicosídicas e o terceiro se deve à conversão do alginato em Na_2CO_3 .

As informações moleculares relacionadas ao extrato de própolis vermelha e às cápsulas à base de alginato obtidas por espectroscopia no infravermelho (FTIR-ATR) permitiram a identificação precisa dos tipos de ligação presentes nas diferentes frações analisadas, representando um avanço notável nas caracterizações moleculares desses materiais.

CONCLUSÃO

Portanto, esta técnica de encapsulamento demonstra atributos notáveis e promissores. Ela se distingue por sua capacidade de encapsular compostos bioativos sem induzir alterações significativas, juntamente com sua simplicidade, viabilidade e facilidade de manipulação durante a preparação. A inovação deste trabalho está na preservação bem-sucedida das características químicas dos compostos, conforme demonstrado pela análise FTIR-ATR, juntamente com a incorporação eficiente de própolis vermelha e nanopartículas, aumentando sua

estabilidade e potencial terapêutico. Os esforços de pesquisa futuros devem incluir atividade antimicrobiana e avaliações de toxicidade para garantir o consumo seguro em concentrações apropriadas.

Agradecimentos

Este projeto foi parte da tese do autor IFBDR. Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) pelo apoio financeiro.

CAPÍTULO 5

Explorando o potencial antimicrobiano de esferas carregadas com extrato de própolis vermelha e nanocompósito Ag-Zno/AgO

EXPLORANDO O POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE ESFERAS CARREGADAS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA E NANOCOMPÓSITO AG-ZNO/AGO

RESUMO

A própolis vermelha tem atraído cada vez mais interesse entre pesquisadores devido às suas propriedades antibacterianas e antifúngicas bem documentadas, que têm implicações na saúde e na agricultura. Utilizar extrato de própolis vermelha em sistemas de microencapsulação, particularmente empregando gelificação iônica, é uma via promissora para otimizar sua eficácia terapêutica. Além disso, incorporar nanopartículas metálicas nesses sistemas representa uma nova abordagem para

aumentar as propriedades antimicrobianas, dada sua eficácia estabelecida contra uma ampla gama de microrganismos, abrangendo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus. Este estudo avalia o potencial antimicrobiano de esferas derivadas de gelificação iônica encapsulando extrato de própolis vermelha e nanopartículas metálicas. Seis formulações (F1 a F6) foram sintetizadas e submetidas à avaliação antimicrobiana. O ensaio de difusão em disco foi empregado para investigar a atividade antifúngica contra patógenos relevantes para a agricultura, incluindo *Trichoderma afroharzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Diaporthe caulivora*. A atividade antimicrobiana foi ainda mais elucidada usando métodos de difusão e concentração inibitória mínima (MIC) contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*. Todas as formulações exibiram atividade antimicrobiana contra as cepas testadas, exceto *T. afroharzianum*. Notavelmente, a formulação F3 (alginato+ZnOAg-NPs) demonstrou atividade superior contra *S. aureus*; no entanto, as formulações F4 (alginato+EPV), F5 (alginato+EPV+ZnO-NPs) e F6 (alginato+EPV+ZnOAg-NPs) exibiram efeitos inibitórios significativos no crescimento geral do patógeno. Essas descobertas ressaltam o potencial inovador do extrato de própolis vermelha e dos nanomateriais (ZnO e Ag-ZnO/AgO) no avanço do desenvolvimento de agentes antimicrobianos, oferecendo eficácia contra fungos e bactérias e mantendo uma promessa substancial para aplicação em biotecnologia verde.

Palavras-chave: compostos fenólicos, atividade microbiológica, nanopartículas, esferas, nanocompósitos, nanomateriais metálicos.

INTRODUÇÃO

A crescente resistência microbiana aos antimicrobianos convencionais apresenta um desafio global significativo para a saúde, obrigando a busca por novas abordagens terapêuticas. Nesse meio, a própolis vermelha, uma resina natural sintetizada por abelhas, tem atraído atenção devido aos seus atributos antimicrobianos validados (Freitas et al., 2017; Duarte et al., 2018; Silva et al., 2020; Javed et al., 2022). Ao mesmo tempo, as nanopartículas metálicas têm demonstrado eficácia contra um amplo espectro de microrganismos patogênicos (Rudramurthy et al., 2016; Duarte et al., 2022; Kaur et al., 2023).

A estratégia de encapsular o extrato de própolis vermelha (EPV) por meio de gelificação iônica apresenta um caminho promissor para aumentar a estabilidade e a

eficácia de compostos bioativos. Essa técnica de encapsulamento não apenas protege os compostos fenólicos da degradação oxidativa, mas também permite a liberação controlada do ingrediente ativo, estendendo assim sua atividade antimicrobiana (Jansen-Alves et al., 2023; Martinović et al., 2023).

A incorporação de nanopartículas metálicas em formulações farmacêuticas pode aumentar suas propriedades biológicas. Entre essas propriedades, destacam-se suas atividades antioxidantes, antitumorais, bactericidas, fungistáticas e leishmanicidas, destacando suas diversas aplicações no campo da saúde (Sousa et al., 2014; Reis et al., 2015; Souza et al., 2020; Aboyewa et al., 2021; Massironi et al., 2022).

Além do domínio da saúde, a agricultura lida com patógenos como *Diaporthe caulivora*, *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma afroharzianum*. *Diaporthe caulivora*, por exemplo, não apenas induz a podridão de sementes e vagens, mas também causa cancro do caule da soja, causando perdas substanciais em regiões produtoras de soja em todo o mundo (Mena et al., 2020; Mena et al., 2022). *Fusarium oxysporum* representa um desafio crescente para o cultivo de feijão-mungo, sendo transmitido pelo solo e capaz de infectar sistemas de raízes de leguminosas por meio de feridas. Sua prevalência é particularmente pronunciada em regiões de baixa altitude com solos argilosos pesados e excesso de umidade (Sun et al., 2020; Batzer et al., 2022; Rocha et al., 2023). Espécies de *Trichoderma*, embora tipicamente consideradas simbioses benéficas do solo e agentes de biocontrole contra patógenos de plantas, também foram implicadas na podridão da espiga no milho nos EUA e na Europa, representando ameaças potenciais aos agricultores (Pfordt et al., 2020).

Portanto, alavancar as propriedades antimicrobianas das nanopartículas de ZnO e ZnOAg com os efeitos sinérgicos de compostos bioativos, como os encontrados na própolis vermelha, é promissor para formular soluções eficazes contra fungos e bactérias (Baptista et al., 2018).

Rodrigues et al. (2024) investigaram preliminarmente as características físico-químicas e a atividade antioxidante de esferas obtidas por meio de gelificação iônica carregadas com EPV e nanopartículas metálicas (ZnO e ZnOAg), produzindo resultados notáveis e promissores. Eles encapsularam com sucesso os compostos bioativos de EPV e nanopartículas, preservando suas características químicas enquanto aumentavam a estabilidade e a atividade antioxidante.

Este estudo se esforça para avaliar a eficácia antimicrobiana dessas esferas, com o objetivo de desenvolver novas estratégias terapêuticas contra infecções microbianas resistentes, oferecendo assim insights valiosos para futuras aplicações na área da saúde.

METODOLOGIAS

Atividade fungistática *in vitro*

A atividade antifúngica das amostras foi medida de acordo com a metodologia proposta por Charannya et al. (2018), com algumas modificações. O Ágar Dextrose Batata (ADP) foi usado como meio de cultura para todos os microrganismos avaliados. As nanopartículas foram colocadas equidistantes umas das outras, e 3 µL de uma solução contendo 10⁶ esporos de *Trichoderma afroharzianum* 10BR1 (CCC 115-23), *Trichoderma afroharzianum* UEPA AR 12 (CCC 175-23), *Fusarium oxysporum* (CCC 186-06) e *Diaporthe caulivora* (CCC 120-20) foram inoculados no centro da placa (Figura 1). Em seguida, a distância do centro da placa até o ponto onde cada amostra foi colocada foi medida a cada 24 horas, durante 10 dias. Os experimentos foram realizados em triplicata, e as medidas foram expressas em mm, comparando-as com a amostra F1 (amostra controle), que não contém extrato de própolis vermelha nem nanopartículas.

Ensaio antimicrobiano pelo método de difusão

Cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC) foram usadas no ensaio antimicrobiano para avaliação qualitativa, incluindo a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922) e o fungo *Candida albicans* (ATCC 90028).

O método de difusão em ágar foi realizado de acordo com os documentos M44-A3 (CLSI, 2018) e M100 (CLSI, 2020) do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) com modificações. Os microrganismos avaliados foram previamente cultivados em placas de Petri contendo ágar Luria Bertani (LB) (para cepas bacterianas) e ágar Sabouraud (para cepas fúngicas) e incubados a 37 °C por 24 horas. Após o período de crescimento, suspensões microbianas foram preparadas em solução salina estéril, e a concentração foi ajustada por comparação com um padrão de turbidez na escala de McFarland de 0,5. Em seguida, usando um

cotonete estéril, o inóculo foi semeado em placas contendo ágar Mueller Hinton (MH) (para bactérias) e ágar Sabouraud (para fungos) suavemente e em diferentes direções, tentando cobrir toda a superfície.

Posteriormente, as esferas foram adicionadas às placas semeadas usando pinças. Após um período de incubação de 24 horas a 37 °C, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos. Como controle positivo, um disco de Gentamicina (30 µg) e Fluconazol (50 µg) foram usados.

Todo o ensaio foi realizado em triplicata, e o termo ativo foi atribuído aos produtos que apresentaram halos de inibição do crescimento microbiano.

Ensaio antimicrobiano pelo método CIM

Para avaliações antimicrobianas quantitativas, os produtos foram testados contra as seguintes cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 900028).

A atividade antimicrobiana foi determinada usando a metodologia de microdiluição em caldo pelo CLSI (2018). Uma solução estoque foi preparada diluindo as esferas em solução tampão fosfato, e um volume de 100 µL foi dispensado na primeira linha de cada coluna de uma microplaca de 96 poços contendo 100 µL de Mueller Broth Hinton. A solução foi homogeneizada e descartada após a última linha da coluna, com concentrações entre 31,2 e 64000 µg/mL para as amostras e 15,6 µg/mL para a substância controle (Meropenem). Após esta etapa, 5 µL de um inóculo microbiano preparado pela técnica de suspensão direta, com turbidez ajustada ao padrão McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/mL), foram dispensados em cada poço. Controles negativos (solução tampão fosfato) e positivos (meropenem) foram incluídos, e todos os testes foram realizados em triplicata. Após incubação em incubadora bacteriológica a $\pm 36^\circ\text{C}$ por 18-24 horas, 20 µL de solução de cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (TTC) a 1% foram adicionados a todos os poços, e a CIM foi determinada como a menor concentração que inibiu o crescimento bacteriano.

Análise estatística

A significância estatística foi determinada usando ANOVA unidirecional. Todas as análises foram conduzidas em triplicado com o software estatístico R (v.

4.2.0; R Core Team 2022) e os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

Atividade fungistática *in vitro*

Ao avaliar a atividade contra *F. oxysporium* (Tabela 1), foi observada uma inibição notável do crescimento fúngico em todas as formulações. F2 e F3 exibiram atividade inibitória comparável à substância de controle (F1) utilizada no estudo durante todo o período analisado.

Tabela 1 - Avaliação da atividade inibitória contra *Fusarium oxysporum*.

<i>F. oxysporium</i> (CCC 186-06)						
Dia	F1	F2	F3	F4	F5	F6
4	2,1	1,8	1,5	1,3	1,4	1,3
5	2,5	2,2	2,2	1,6	1,7	1,7
6	3	2,9	2,9	1,9	1,9	1,9
7	3	3,1	2,9	2,1	2,1	2,1
9	4,1	4,2	4,1	2,2	2,3	2,2

F1= alginato, F2= alginato+ZnO-NPs, F3= alginato+ZnOAg-NPs, F4= alginato+EPV, F5= alginato+EPV+ZnO-NPs e F6= alginato+EPV+ZnOAg-NPs.

As formulações F4, F5 e F6 exibiram eficácia fungistática aprimorada contra esse fungo durante todo o estudo em comparação a formulação controle (F1). Essas descobertas sugerem que essa atividade aumentada é atribuída à inclusão do extrato de própolis vermelha na formulação, pois ao comparar as formulações F5 e F6 com F4, os valores não demonstram diferenças significativas.

Observações semelhantes foram feitas para *D. caulivora* (Tabela 2). As amostras F2 e F3 também demonstraram atividade inibitória semelhante ao controle (F1), enquanto F4, F5 e F6 exibiram eficácia comparável na redução do crescimento fúngico durante o período de teste, indicando atividade antifúngica aprimorada na presença de EPV.

Tabela 2 - Avaliação da atividade inibitória contra *Diaporthe caulivora*.

<i>D. caulivora</i> (CCC 120-20)						
Dia	F1	F2	F3	F4	F5	F6
4	2,8	2,9	2,5	1,7	1,8	1,7
5	3,3	3,8	3,9	1,8	2	1,8
6	4	4	4	2,2	2,2	2,2
7	4,2	4,2	4,2	2,3	2,4	2,3
9	4,3	4,2	4,2	2,9	3	2,9

F1= alginato, F2= alginato+ZnO-NPs, F3= alginato+ZnOAg-NPs, F4= alginato+EPV, F5= alginato+EPV+ZnO-NPs e F6= alginato+EPV+ZnOAg-NPs.

Certas espécies de *Trichoderma* spp são conhecidas por serem benéficas, promovendo o crescimento das plantas (Hang et al., 2022) e contribuindo para a fitoestabilização de locais contaminados com metais (Rocha et al., 2023).

Ao avaliar a espécie *T. afroharzianum* 10BR1 (Tabela 3), as formulações F2 e F3 não exibiram diferenças significativas na inibição do crescimento fúngico em comparação com o controle (F1) ao longo dos dias observados. No entanto, as amostras F4, F5 e F6 demonstraram atividade fungistática durante os 4 dias iniciais do estudo quando contrastadas com o controle. Apesar dessa inibição do crescimento, os resultados sugerem que o fungo superou esse obstáculo após 96 horas, retomando o crescimento depois disso.

Tabela 3 - Avaliação da atividade inibitória contra *Trichoderma afroharzianum*.

<i>T. afroharzianum</i> 10BR1 (CCC 115-23)						
Dia	F1	F2	F3	F4	F5	F6
2	2,3	2,4	2,4	1,9	1,8	1,7
3	4,3	4,3	4,3	2,2	2,3	2,1
4	4,3	4,3	4,3	2,4	2,4	2,3
6	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3

F1= alginato, F2= alginato+ZnO-NPs, F3= alginato+ZnOAg-NPs, F4= alginato+EPV, F5= alginato+EPV+ZnO-NPs e F6= alginato+EPV+ZnOAg-NPs.

No entanto, no caso da atividade antifúngica para *T. afroharzianum* (Tabela 4), não houve diferenças significativas na atividade fungistática em todas as

formulações testadas. Isso sugere que as formulações examinadas não exerceram um efeito inibitório discernível sobre essa espécie em particular.

Tabela 4 - Avaliação da atividade inibitória contra *Trichoderma afroharzianum*.

<i>T. afroharzianum</i> UEPA AR 12 (CCC 175-23)						
Dia	F1	F2	F3	F4	F5	F6
2	2,4	2,4	2,3	2,1	2,2	2
3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
4	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3

F1= alginato, F2= alginato+ZnO-NPs, F3= alginato+ZnOAg-NPs, F4= alginato+EPV, F5= alginato+EPV+ZnO-NPs e F6= alginato+EPV+ZnOAg-NPs.

Após essas avaliações, a inibição do crescimento fúngico parece depender da presença de extrato de própolis vermelha na formulação, conforme evidenciado pelas diferenças não significativas entre as amostras F4, F5 e F6. De fato, essas descobertas sugerem um potencial efeito fungistático dessas formulações contra os patógenos *F. oxysporum* e *D. caulivora*.

Este estudo revela resultados intrigantes para o domínio agrícola, indicando o potencial das formulações para impedir o crescimento de fungos patogênicos que podem impactar plantações de pequena e grande escala. Notavelmente, a inibição do crescimento de *T. afroharzianum* 10BR1 pode estimular investigações sobre milho afetado por esse fungo nos EUA e na Europa (Pfordt et al., 2020). No entanto, mais estudos são necessários para compreender de forma abrangente os mecanismos subjacentes e otimizar essas formulações para aplicações práticas.

Ensaio antimicrobiano

Os resultados apresentados na Tabela 5 oferecem uma análise comparativa dos resultados de sensibilidade para vários microrganismos contra diferentes formulações de um agente antimicrobiano, avaliados qualitativa e quantitativamente.

Inicialmente, é evidente que os valores de concentração necessários para inibir o crescimento de microrganismos variam consideravelmente entre as espécies testadas em ensaios qualitativos e quantitativos, sugerindo níveis variados de sensibilidade aos agentes antimicrobianos sob análise. Notavelmente, as amostras

F1 e F2 não exibiram atividade significativa, indicando resistência potencial a essas formulações.

Tabela 5 - Comparação qualitativa e quantitativa da inibição do crescimento microbiológico de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Amostras	Método qualitativo (mm)			Método quantitativo (µg/mL)		
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
F1	SA	SA	SA	SA	64000	SA
F2	3	SA	SA	SA	SA	64000
F3	4	4	SA	4000	16000	32000
F4	9	6	5	32000	16000	SA
F5	9	7	6	16000	16000	32000
F6	9	7	7	16000	16000	64000
Meropeném	-	-	-	1.95	1.95	-
Gentamicina	25	22	-	-	-	-
Fluconazol	-	-	20.5	-	-	-

SA= Sem atividade; F1= Alginate; F2= Alginate+ZnO-NPs; F3= Alginate+ZnOAg-NPs; F4= Alginate+RPE; F5= Alginate+RPE+ZnO-NPs; F6= Alginate+RPE+ZnOAg-NPs. (p < 0.05)

Para *Staphylococcus aureus*, um patógeno bacteriano comumente associado a infecções resistentes a antibióticos, o alginato em combinação com ZnOAg (F3) demonstrou a maior atividade em uma concentração de 4000 µg/mL.

Por outro lado, *Escherichia coli* exibiu sensibilidade relativamente maior aos agentes antimicrobianos testados. Embora tenham exibido o mesmo perfil de atividade inibitória em uma concentração de 16000 µg/mL para as formulações F3-F6 quando avaliadas por MIC, elas exibiram diâmetros de inibição de crescimento variáveis entre elas.

No caso de *Candida albicans*, foi observada uma sensibilidade intermediária a agentes antimicrobianos. As amostras F3 e F5 demonstraram melhor atividade quando comparadas quantitativamente a outras formulações, indicando alta resistência com valores superiores a 64000 µg/mL. No entanto, quando avaliadas qualitativamente, F3 não mostrou atividade. Vale a pena notar que na avaliação qualitativa, as formulações F4, F5 e F6 exibiram diâmetros de inibição substanciais

contra todos os microrganismos testados, sugerindo seu potencial na eficácia como agentes antimicrobianos.

Comparando os resultados com o controle positivo, meropenem (1,95 µg/mL), é notável que as formulações exibem atividade antimicrobiana comparável ou até superior sob certas condições. Isso indica o potencial das formulações testadas como agentes terapêuticos contra infecções causadas por esses microrganismos.

Enquanto a resistência é alta em alguns casos, necessitando de concentrações acima de 64000 µg/mL, em outros cenários, a concentração necessária para inibição do crescimento é menor. Esta observação sugere que diferentes métodos de avaliação influenciam a interpretação dos resultados.

Essas descobertas ressaltam a importância da seleção meticulosa de componentes em formulações antimicrobianas e propõem que a combinação de alginato com nanopartículas e EPV pode representar uma abordagem promissora para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes contra gram-positivos, gram-negativos e fungos no nível clínico. No entanto, pesquisas adicionais são essenciais para entender os mecanismos subjacentes e otimizar essas formulações.

DISCUSSÃO

A observação inicial revela variabilidade significativa na atividade antimicrobiana entre as formulações F1 a F6 contra os microrganismos testados. Por exemplo, a formulação F4 exibiu um diâmetro de inibição de 9 mm para *S. aureus*, 6 mm para *E. coli* e 5 mm para *C. albicans*, indicando atividade moderada contra todos os três microrganismos. Em contraste, a formulação F3 exibiu um diâmetro de inibição de 4 mm para *S. aureus* e *E. coli*, sem efeito sobre *C. albicans*, sugerindo atividade antimicrobiana seletiva.

Além disso, os resultados quantitativos (expressos em µg/mL) delineiam a concentração necessária para inibir o crescimento microbiano. Na formulação F4, por exemplo, a concentração necessária para inibir *S. aureus* foi de 32000 µg/mL, enquanto para *E. coli* foi de 16000 µg/mL, e para *C. albicans* ultrapassou 64000 µg/mL. Isso sugere variações na sensibilidade microbiana às diferentes formulações testadas.

A comparação com controles positivos revela que todas as amostras apresentam atividade antimicrobiana comparável à do antimicrobiano de referência, demonstrando o potencial das formulações em estudo.

Um estudo de Silva et al. (2017) avaliou os efeitos antimicrobianos in vitro de extratos de própolis vermelha, verde e marrom de várias regiões do Brasil, obtidos por métodos de extração etanólica e supercrítica. A própolis vermelha demonstrou a maior atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (62,5 µg/mL), embora nenhum dos extratos tenha exibido atividade contra *E. coli* ou *C. albicans*.

Achados semelhantes foram relatados por Machado et al. (2016), que descreveram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis vermelha contra *S. aureus* e *E. coli*, com uma concentração bactericida mínima entre 800-1600 µg/mL. Outros estudos também demonstraram a atividade antimicrobiana do extrato de própolis vermelha contra *C. albicans* (Sokolonski et al., 2021).

O encapsulamento do extrato hidroetanólico de própolis vermelha em nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) por Silva et al. (2020) exibiu potencial antimicrobiano contra *S. aureus*, com uma concentração inibitória mínima variando de 15,6 a 125 µg/mL.

Estudos realizados por Béji-Srairi et al. (2020), Benhanifia et al. (2014), Nedji e Loucif-Ayad (2014) avaliaram amostras de própolis coletadas de áreas do Mediterrâneo e confirmaram a eficácia do EEP em *S. epidermidis*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) usando um ensaio de difusão em disco em uma faixa de concentração de 100 a 1000 µg/mL, com uma zona inibitória que variou de 4,6 a 21,4 mm. A atividade antimicrobiana realizada por Vicã et al. (2021) obtiveram maior sensibilidade (32 mm) para *S. aureus* e *E. coli* ao combinar mel e extrato aquoso de própolis coletado na Romênia.

Nanocompósitos (ZnO/Ag) sintetizados por Busila et al. (2023) mostraram maior atividade antimicrobiana contra cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Esparza-González et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de ZnO modificadas por DMSO e APTES contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, observando efeitos inibitórios no crescimento bacteriano.

Fonseca e colaboradores (2019) sintetizaram nanocompósitos de ZnO dopados com nanocristais de prata (Ag) e óxido de prata (AgO) (ZnO:Ag-AgO) e avaliaram se eles poderiam controlar ou prevenir a formação de biofilmes de *Salmonella enteritidis* e *Salmonella heidelberg* e a capacidade de entrar em ovos. Eles observaram que para a análise de *S. enteritidis* pós-formação de biofilme, o nanocompósito não foi capaz de eliminar o biofilme, mas a carga bacteriana foi menor que a do grupo controle, além disso, esse microrganismo foi capaz de se

infiltrar nos ovos e foi encontrado tanto na clara quanto na gema. Quanto às análises de *S. heidelberg* aplicadas em cascas de ovos antes da formação do biofilme, o tratamento com o nanocompósito impediu a formação de biofilme e *S. heidelberg* não conseguiu atingir a gema, embora a infiltração da bactéria nos ovos tenha sido observada em todos os grupos tratados, foi significativamente menor nos ovos pré-tratados com ZnO:Ag-AgO.

Barbosa et al. (2022) avaliaram nanocompósitos de ZnO:Ag-AgO como uma opção para o tratamento da leishmaniose cutânea. Eles observaram que 65% e 68% de AgO inibiram a replicação extra e intracelular de *Leishmania braziliensis* e apresentaram alto índice de seletividade. Nanocompósitos na concentração de 65% de AgO modularam a ativação, expressão de receptores de superfície e produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico humano em direção a um fenótipo pró-inflamatório, mostrando-se uma opção promissora para o tratamento de *L. braziliensis*.

Estudos realizados por Moura et al. (2022) sintetizaram nanocompósitos usando Ag-ZnO e AgO-NPs (Ag-ZnO/AgO NPs) e avaliaram o tratamento tópico em camundongos. Eles observaram que feridas tratadas com o nanocompósito apresentaram fechamento acelerado, melhorando a cicatrização e reduzindo o processo inflamatório, não citotoxicidade, especialmente em queratinócitos, aumentando a deposição de colágeno na matriz extracelular e aumentando a atividade das metaloproteinases 2 e 9. Assim, o nanocompósito teve potencial para ser uma estratégia de uso tópico em formulações de novos medicamentos para tratamento de feridas.

Estudos de Galletti et al. (2017) e Vică et al. (2022) demonstraram a atividade antifúngica do extrato de própolis verde e do extrato de própolis romena contra *Fusarium* spp., consistente com os achados deste estudo. No entanto, não há relatos anteriores sobre o uso de EPV e Ag-ZnO/AgO contra *Trichoderma afroharzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Diaporthe caulivora*.

Outros estudos demonstraram a atividade antifúngica de nanopartículas sintetizadas contra *F. oxysporum*. Farhana et al. (2022) sintetizaram nanopartículas de ZnO que exibiram inibição significativa do crescimento micelial na murcha de *F. oxysporum* do grão-de-bico, enquanto Abdelaziz et al. (2022) biossintetizaram ZnO-NPs em *Penicillium expansum*, que suprimiu a doença da murcha de *Fusarium* em *Solanum melongena* L. cultivada.

Em outro estudo contra *F. oxysporum*, Yao et al. (2020) sintetizaram nanopartículas de prata (AgNPs) usando *Trichoderma citrinoviride* e *Trichoderma velutinous*, que mostraram atividade antifúngica aprimorada com concentrações crescentes de nanopartículas de prata.

Portanto, este estudo sugere o uso de bionanomateriais como uma alternativa aos antimicrobianos sintéticos para controlar ou erradicar infecções e doenças fúngicas ou bacterianas. A diversidade na resposta antimicrobiana depende de fatores como estrutura celular microbiana, mecanismos de resistência específicos e as propriedades do próprio agente antimicrobiano.

CONCLUSÃO

A conclusão do estudo destaca o potencial promissor das formulações contendo extrato de própolis vermelha (EPV) e nanopartículas de ZnO (óxido de zinco) e ZnOAg (óxido de zinco/prata) como agentes antimicrobianos eficazes. A variabilidade observada na atividade antimicrobiana entre diferentes formulações sugere a importância da seleção cuidadosa dos componentes para otimizar a eficácia. Os resultados demonstram que as formulações foram capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como fungos. A comparação com o controle positivo, meropeném, ilustra que as formulações testadas apresentam atividade antimicrobiana comparável ao antimicrobiano de referência, indicando seu potencial terapêutico contra infecções causadas por esses microrganismos.

Estudos anteriores sobre extrato de própolis vermelha e nanopartículas de ZnO e ZnOAg corroboram os achados deste estudo, destacando sua eficácia contra uma variedade de microrganismos patogênicos. Além disso, foi demonstrado que a síntese de nanopartículas pode aumentar a atividade antimicrobiana contra patógenos fúngicos, como *Fusarium* spp., *Diaporthe* spp. e *Candida* spp. e bactérias *Staphylococcus* spp. e *Escherichia* spp.

Esses resultados enfatizam a importância da pesquisa contínua no desenvolvimento de agentes antimicrobianos alternativos, particularmente à luz da crescente resistência aos antimicrobianos convencionais. O uso de bionanomateriais pode representar uma abordagem promissora para o controle e erradicação de infecções bacterianas e fúngicas, com potenciais aplicações em ambientes clínicos e

agrícolas. No entanto, mais estudos são necessários para entender completamente os mecanismos subjacentes e otimizar essas formulações para uso prático.

Agradecimentos

This project was part of the author's thesis IFBDR. The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Alagoas State Research Support Foundation (FAPEAL), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and the Northeastern Biotechnology Network (RENORBIO) for financial support.

Conflitos de interesse

Gostaríamos de confirmar que não há conflitos de interesse conhecidos associados a esta publicação. O manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores nomeados e não há outras pessoas que satisfizeram os critérios de autoria, mas não estão listadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com as pesquisas realizadas e com os resultados obtidos, é possível concluir que a aplicação e o avanço da nanotecnologia na área da saúde, oferecem uma nova alternativa tecnológica que abre novas possibilidades para aumentar a eficácia de tratamentos já estabelecidos clinicamente. Esse desenvolvimento está gerando impactos concretos tanto para a comunidade científica quanto para a sociedade. A adição de nanomateriais oferece várias vantagens em comparação com os sistemas farmacêuticos tradicionais, como o aumento da biodisponibilidade, alcançando melhoria na resposta terapêutica, maior estabilidade dos níveis dos fármacos no organismo, alcançando uma melhor eficácia terapêutica, além de obter uma maior seletividade ao alvo biológico.

Pôde-se observar que o método de encapsulação por gelificação iônica se mostrou eficaz, de baixo custo e de fácil reprodutibilidade, visto que, as caracterizações físico-químicas das microcápsulas com própolis vermelha e associada com as nanopartículas, respectivamente, permitiram inferir que houve a incorporação desses compostos de forma satisfatória na matriz de alginato reticuladas com íons cálcio, apresentando atividades biológicas de interesse tanto para a área da saúde, quanto para a agricultura. Também revelaram que as

formulações propostas se apresentam como um importante produto biodegradável, com boa estabilidade frente à elevadas temperaturas.

Diante disso, sugere-se que novos estudos sejam realizados para analisar os meios de conservação das formulações propostas, assim como testes *in vivo* em *Drosophila melanogaster* ou *Danio rerio* (Zebrafish) para quantificar e avaliar as dosagens tóxicas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, S. et al. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by selfassembly. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 81-92, 2015.

ABOYEWA, J. A. et al. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles Using Some Selected Medicinal Plants from Southern Africa and Their Biological Applications. **Plants**, v. 10, n. 9, p. 1929, 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem [Internet]. Diário Oficial da União, Brasília, 03 mai. 1999. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES_18_1999_COMP.pdf/dd30fd35-e7ea-4f8d-be72-ae2e439191b. Acesso em: 28 de julho de 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Resolução nº 241 de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos [Internet]. Diário Oficial da União, Brasília, 27 de julho de 2018. Disponível em: http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-dadiretoriacolegiada-rdc-n-241-de-26-dejulho-de-2018-34379900. Acesso em: 08 de maio de 2021.

AHIRE, S. A. et al. The Augmentation of nanotechnology era: A concise review on fundamental concepts of nanotechnology and applications in material science and technology. **Results in Chemistry**, v. 4, 100633, 2022.

AHMED, E. M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, p. 105-121, 2015.

- ALBUQUERQUE, A. V. A. **Desenvolvimento e avaliação antimicrobiana de revestimentos para madeira plástica a base de PDMS com nanopartículas de prata e de óxido de zinco utilizando solution blow spraying (SBSp)**. 2017. Dissertação (Mestre em Ciências e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal da Paraíba, 2017.
- ALENCAR, B. B. M.; MORAIS, Y. J. Nutraceuticals and their benefits for user health: integrative literature review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, e484101220396, 2021.
- ALLEN, T. M.; Cullis, P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 36-48, 2013.
- AMIN, M. L.; AHMED, T.; MANNAN, M. A. Development of Floating-Mucoadhesive Microsphere for Site Specific Release of Metronidazole. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, p. 195-200, 2016.
- AN, H. M. et al. Anti-obesity and lipid lowering effects of Bifidobacterium spp. in high fat diet induced obese rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, p. 116, 2011.
- APOLINÁRIO, A. C. et al. Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais 'espaço lá embaixo'. **Química Nova**, v. 43, p. 212-225, 2020.
- APOLINÁRIO, A. C. et al. Polimerossomos versus Lipossomos: a evolução da bala mágica. **Química Nova**, v. 40, p. 810-817, 2017.
- ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 e de Inulina**. 2007. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- ARONSSON, L. et al. Decreased fat storage by *Lactobacillus paracasei* is associated with increased levels of angiopoietin-like 4 protein (ANGPTL4). **PLoS ONE**, v. 5, 2010.
- ARTIGA-ARTIGAS, M. et al. Nanostructured Systems to Increase Bioavailability of Food Ingredients. **Nanomaterials For Food Applications**, p. 13-33, 2019.
- ASHA, A. B.; Narain, R. Chapter 15 - Nanomaterials properties. **Science and Nanotechnology**, p. 343-359, 2020.
- ASLAN, B. et al. Nanotechnology in cancer therapy. **Journal of Drug Targeting**, v. 21, p. 904-913, 2013.
- ASSADPOUR, E.; Jafari, S. M. Chapter 3 - Nanoencapsulation: Techniques and Developments for Food Applications. **Nanomaterials for Food Applications**, v. 1, p. 35-61, 2019.
- ASSIS, L. M. et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 15, p. 99-109, 2012.
- AZEVEDO, L. F. et al. Polymeric nanoparticle systems loaded with red propolis extract: a comparative study of the encapsulating systems, PCL-Pluronic versus Eudragit® E100-Pluronic. **Journal Of Apicultural Research**, v. 57, p. 255-270, 2018.
- AZZI, J. et al. Novel findings for quercetin encapsulation and preservation with cyclodextrins, liposomes, and drug-in-cyclodextrin-in-liposomes. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 328-340, 2018.

BADARÓ, A. C. L. et al. Alimentos probióticos: Aplicações como promotores da saúde humana. *Nutrir Gerais*. **Revista Digital de Nutrição**, v. 2, 2008.

BAGCHI, D. Nutraceuticals and functional foods regulations in the United States and around the world. **Toxicology**, v. 221, p. 1-3, 2006.

BAGHERI, E. et al. Silica based hybrid materials for drug delivery and bioimaging. **Journal of Controlled Release**, v. 277, p. 57-76, 2018.

BANJARE, J. Application of nanotechnology in food technology and targeted drug therapy for prevention of obesity: an overview. **Journal of Critical Reviews**, v. 4, p. 7-11, 2017.

BAPTISTA, P. V. et al. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria - "A Battle of the Titans". **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1441, 2018.

BARBOSA, R. M. et al. Development of Ag-ZnO/AgO Nanocomposites Effectives for *Leishmania braziliensis* Treatment. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 12, p. 2642, 2022.

BARBOSA, V. T. et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Brazilian propolis. **Biotechnol Prog.**, v. 35, n. 6, 2019.

BARHOUM, A. et al. Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations. **Nanomaterials**, v. 12, p. 177, 2022.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, p. 163-171, 2000.

BATZER, JC et al. Screening Mungbean Accessions for Susceptibility to Soybean Fungal Diseases in Iowa. **Plant Health Progress**, v. 23, n. 4, p. 456–465, dez. 2022.

BAZANA, M. T. et al. Lycopene nanoencapsulation in food. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 38-48, 2015.

BAZANA, M. T. et al. Nanoencapsulação de licopeno em alimentos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 38-48, 2015.

BÉJI-SRAIRI, R. et al. Ethanolic extract of Tunisian propolis: chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative properties. **Journal of Apicultural Research**, v. 59, n. 5, p. 917–927, 2020.

BENAVIDES, S. et al. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, v. 204, p. 77–83, 2016.

BENHANIFIA, M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of propolis collected from some localities of Western Algeria. **Acta Alimentaria**, v. 43, n. 3, p. 482–488, 2014.

BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic Mechanisms of Action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, p. 160-174, 2012.

BEŠLO, D. et al. Antioxidant Activity, Metabolism, and Bioavailability of Polyphenols in the Diet of Animals. **Antioxidants (Basel)**, v. 23, p. 1141, 2023.

BIGLIARDI, B.; Galati, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p. 118-129, 2013.

BORTHAKUR, P. et al. Nanoemulsion: preparation and its application in food industry. **Emulsions**, p. 153-191, 2016.

BOTTINI, M.; ROSATO, N.; BOTTINI, N. PEG-modified carbon nanotubes in biomedicine: current status and future challenges. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 3381-3393, 2011.

BOURBON, A. I. et al. Development and characterization of lactoferrin-GMP nanohydrogels: evaluation of pH, ionic strength and temperature effect. **Food Hydrocolloids**, v. 48, p. 292-300, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002**. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e/ou de saúde. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc8888dc3fb c4c6735/RDC_02_2002.pdf?MOD= AJPERES. Acesso em: 11 de maio de 2021.

BREDE, C.; LABHASETWAR, V. Applications of nanoparticles in the detection and treatment of kidney diseases. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 20, p. 454-465, 2013.

BRIZUELA, M. A.; Serrano, P.; Perez, Y. Studies on probiotics properties of two *Lactobacillus* strains. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, p. 95-99, 2001.

BUSILA, M. et al. Antibacterial and Photocatalytic Activity of ZnO/Au and ZnO/Ag Nanocomposites. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 23, p. 16939, 2023.

CAL, O. E.; Khutoryanskiy, V. V. Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products. **European Polymer Journal**, v. 65, p. 252-267, 2015.

CAMBRUSSI, A. N. C.O. et al. O papel da nanotecnologia na redução do estresse oxidativo: uma revisão. **Boletim Informativo Geum**, v. 9, p. 1-11, 2018.

CARMO NETO, J. R. et al. Antiprotozoal and Anthelmintic Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 2127-2141, 2022.

CARNOVALE, C. et al. Size, shape and surface chemistry of nano-gold dictate its cellular intraction, uptake and toxicity. **Progress in Materials Science**, v. 83, p. 152-190, 2016.

CARVALHO, C. et al. Evidence-Based Studies and Perspectives of the Use of Brazilian Green and Red Propolis in Dentistry. **European Journal of Dentistry**, v. 13, n. 03, p. 459-465, 2019.

CARVALHO, L. M. **Síntese de filmes de óxido de zinco dopados com nanopartículas de prata aplicados em sensores de gás**. 2019. Dissertação (Mestre em Engenharia mecânica) – Universidade Estadual Paulista, 2019.

CARVALHO, V. F. M. et al. Co-encapsulation of paclitaxel and C6 ceramide in tributyrin-containing nanocarriers improve co-localization in the skin and potentiate cytotoxic effects in 2D and 3D models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, p. 131-146, 2017.

CASTLO, R. M.; SILVA, L. C.; FURTADO, R. F. Gelificação Iônica: Técnica Eficaz Para Encapsulação De Compostos Ativos - Uma Revisão. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 18, p. 546–560, 2020.

CASTRO, D. L.; CAVALCANTE, M. P.; PEDROSA, M. C. G. Nanotechnology and polymers: review of themes for chemistry classes. **Revista Thema**, v. 16, p. 313-330, 2019.

CATS, A. et al. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing Milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. **AP&T**, v. 17, p. 429-435, 2003.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 109-117, 2015.

CHAPMAN, C. M. C.; Gibson, G. R. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? **European Journal of Nutrition**, v. 50, p. 1-17, 2011.

CHARANNYA, S. et al. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of silver nanoparticles and 2% chlorhexidine gluconate when used alone and in combination assessed using agar diffusion method: An In vitro study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 9, n. 6, p. 204, 2018.

CHAVALI, M. S.; Nikolova, M. P. Metal oxide nanoparticles and their applications in nanotechnology. **SN Applied Science**, v. 1, p. 607, 2019.

CHAVES, M. A. et al. Structural Characterization of Multilamellar Liposomes Coencapsulating Curcumin and Vitamin D-3. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 549, p. 112–121, 2018.

CHEN, D. et al. Kidney-targeted drug delivery via rhein-loaded polyethyleneglycol-co-polycaprolactone-co-polyethylenimine nanoparticles for diabetic nephropathy therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 3507-3527, 2018.

CHEN, S. et al. Core-Shell Nanoparticles for Co-Encapsulation of Coenzyme Q10 and Piperine: Shell Hydrogel Surface Engineering around the Protein Core. **Food Hydrocolloids**, v. 103, p.105651, 2020.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A2**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 9th ed.: approved guideline M11**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI supplement M100**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, West, Pennsylvania 19087 USA, 2020.

CODEVILLA, C. F. et al. Nanoestruturas contendo compostos bioativos extraídos de plantas. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 142– 151, 2015.

COMINI, E. et al. Nanoscience and nanotechnology of metal oxides for chemical sensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 179, p. 3-20, 2012.

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Food hydrocolloids microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 442–457, 2016.

COSTA, M. P. et al. Leite fermentado: Potencial alimento funcional. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, p. 13, 2013.

CSERNATONI, F. et al. Sea buckthorn juice, tomato juice and pumpkin oil microcapsules/microencapsulated with health benefit on prostate disease – obtaining process, characterization and testing properties. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 23, p. 13214-13224, 2018.

DALLABONA, I. D. et al. Development of alginate beads with encapsulated jabuticaba peel and propolis extracts to achieve a new natural colorant antioxidant additive. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.163, p. 1421-1432, 2020.

DARAE, H. et al. Application of liposomes in medicine and drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, p. 381-391, 2016.

DAS, S. et al. Encapsulation in chitosan-based nanomatrix as an efficient green technology to boost the antimicrobial, antioxidant and in situ efficacy of Coriandrum sativum essential oil. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 294-305, 2019.

DE FARIAS, S. S. et al. Microencapsulation of riboflavin with galactomannan biopolymer and F127: Physicochemical characterization, antifungal activity and controlled release. **Industrial Crops and Products**, v. 118, p. 271-281, 2018.

DE FREITAS, M. C. D. et al. Biological Activities of Red Propolis: A Review. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 11, n. 1, p. 3–12, 2018.

DELMAS, T et al. How to prepare and stabilize very small nanoemulsions. **Langmuir**, v. 27, p. 1683-1692, 2011.

DENIPOTE, F. G.; Trindade, E. B. S. M.; Burini, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 47, 2010.

DHAKAD, G. S. et al. Nanotechnology: Trends and future prospective. **Global Journal of Bio-science and Biotechnology**, v. 6, p. 548–553, 2017.

DIAS, M. R.; COSTA, H. S.; LEÃO, R. C. Obtaining and characterization of alginate/bioactive glass beads. *Perspectivas da Ciência e Tecnologia*, v. 12, p. 122-137, 2020.

DÍAZ, U.; BRUNEL, D.; CORMA, A. Catalysis using multifunctional organosiliceous hybrid materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 4083-4097, 2013.

DO CARMO NETO, JR et al. Antiprotozoal and Anthelmintic Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, n. 12, p. 2127–2141, 2022.

DOSHI, N.; MITRAGOTRI, S. Designer biomaterials for nanomedicine, **Advanced Functional Materials**, v. 19, p. 3843-3854, 2009.

DU, W. L. et al. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 385–389, 2009.

DU, Z. et al. Fabrication of chitosan-casein nanohydrogels functionalized with N-acetyl-L-cysteine and L-cysteine for entrapment of hydrophilic and hydrophobic bioactive compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 377-384, 2019.

DUARTE, I. F. B. et al. Development and characterization of microencapsulated red propolis from Alagoas. (Ed.) **Atena: Impacts of Technologies in Biological and Health Sciences**, p.81-88, 2018.

DUARTE, I. F.B. et al. Natural Probiotics and Nanomaterials: A New Functional Food. Prebiotics and Probiotics - From Food to Health. **IntechOpen**, 2022.

ERKOC, P.; Ulucan-Karnak, F. Nanotechnology-based antimicrobial and antiviral surface coating strategies. **Prosthesis**, v. 3, p. 25-52, 2021.

ESPARZA-GONZÁLEZ, S. C. et al. Effects of different surface modifying agents on the cytotoxic and antimicrobial properties of ZnO nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 37, p. 134–141, 2016.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/.

FARAJI, A. H; Wipf, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2950-2962, 2009.

FARHANA et al. ZnO Nanoparticle-Mediated Seed Priming Induces Biochemical and Antioxidant Changes in Chickpea to Alleviate Fusarium Wilt. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 7, p. 753, 2022.

FARHANG, B. Nanotechnology and lipids. **Lipid Technology**, v. 19, p. 132-135, 2007.

FARIAS, T. G. S. et al. Alimentos simbióticos: uso da coencapsulação como forma de veiculação de probióticos e prebióticos. Ed. **Científica digital - Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, p. 39-58, 2021.

FENECH, M. et al. Vitamin C content in fruits: biosynthesis and regulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2019.

FERREIRA, A. S. Ciência E Tecnologia De Alimentos: Conceitos E Aplicações. **Eduft**, p. 109-122, 2019.

FIGUEIRA, C. S.; Santos, R. P. Biossíntese de nanopartículas de ouro utilizando vegetais. **Nanocell News**, v. 4, 2017.

FILHO, W. F. S. B. et al. Alimentos funcionais probióticos, um novo estilo de vida. **Congresso internacional da agroindústria (CIAGRO)** – Ciência, tecnologia e inovação: do campo à mesa, 25 a 27 de setembro, 2020.

FLIEGER, J. et al. Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. **Materials (Basel)**, v. 14, p. 4135, 2021.

FLORES-HERNÁNDEZ, C. G. et al. Synthesis of a Biodegradable Polymer of Poly (Sodium Alginate/Ethyl Acrylate). **Polymers (Basel)**, v. 13, p. 504, 2021.

FONSECA, B. B. et al. Nanocomposite of Ag-Doped ZnO and AgO Nanocrystals as a Preventive Measure to Control Biofilm Formation in Eggshell and Salmonella spp. Entry Into Eggs. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 217, 2019.

FRENT, O. D. et al. Sodium Alginate-Natural Microencapsulation Material of Polymeric Microparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 12108, 2022.

FUCIÑOS, C. et al. Smart Nanohydrogels for Controlled Release of Food Preservatives. **Antimicrobial Food Packaging**, p. 349-362, 2016.

FUKUTA, T. et al. Enhancement of antioxidative activity of astaxanthin by combination with an antioxidant capable of forming intermolecular interactions. **Free Radical Research**, v. 54, p. 818-828, 2020.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-78, 1989.

GALLETTI, J. et al. Antibiofilm Activity of Propolis Extract on *Fusarium* Species from Onychomycosis. **Future Microbiology**, v. 12, n. 14, p. 1311–1321, 2017.

GANJE, M. et al. Mathematical and fuzzy modeling of limonene release from amylose nanostructures and evaluation of its release kinetics. **Food Hydrocolloids**, v. 95, p. 186-194, 2019.

GARCIA, D. G. et al. Synthesis of Silver Nanoparticles by Electrodeposition Technique for Biosensor Development. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, p. 31130-31145, 2021.

GARCIA-CEJA, A et al. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **Food Science and Technology**, v. 63, p. 482-489, 2015.

GELPERINA, S. et al. The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 172, p. 1487-1490, 2005.

GIBNEY, S. et al. Towards nanobioelectronic medicine: Unlocking new applications using nanotechnology. **Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 13, p. e1693, 2021.

GRZESIK, M. et al. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v. 241, p. 480–492, 2018.

GUERRA, R. O. et al. Metallic Nanoparticles: A New Frontier in the Fight Against Leishmaniasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 4547-4573, 2022.

GUO, C.; YIN, J.; CHEN, D. Co-encapsulation of curcumin and resveratrol in a novel nutraceutical hyalurosomes nanofood delivery system based on oligohyaluronic acid-curcumin polymer. **Carbohydrate Polymers**, v. 181, p. 1033-1037, 2018.

HAMLAOUI, I. et al. Experimental and theoretical study on DPPH radical scavenging mechanism of some chalcone quinoline derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1156, p. 385–389, 2018.

HANG, X. et al. Trichoderma-amended biofertilizer stimulates soil resident *Aspergillus* population for joint plant growth promotion. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 8, n. 1, p. 57, 2022.

HARIKUMAR, P. S.; ARAVIND, A. Antibacterial Activity of Copper Nanoparticles and Copper Nanocomposites against *Escherichia coli* Bacteria. **International Journal of Sciences**, v. 2, p. 84-90, 2016.

HENRICH, V. E. The surfaces of metal oxides. **Reports on Progress in Physics**, v. 48, p. 1481-1541, 1985.

HESAMI, S. et al. Synthesis and characterization of chitosan nanoparticles loaded with greater celandine (*Chelidonium majus* L.) essential oil as an anticancer agent on MCF-7 cell line. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 194, p. 974-981, 2022.

HICKEY, S.; ROBERTS, H. J.; MILLER, N. J. Pharmacokinetics of oral vitamin C. **Journal of Nutritional & Environmental Medicine**, v. 17, p. 169-177, 2008.

HOANG, N. H. et al. Chitosan Nanoparticles-Based Ionic Gelation Method: A Promising Candidate for Plant Disease Management. **Polymers**, v. 14, p. 662, 2022.

JAHANGIRIAN, H. et al. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: Green nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2957-2978, 2017.

JANIK, M. et al. Nano-/Microcapsules, Liposomes, and Micelles in Polysaccharide Carriers: Applications in Food Technology. **Applied Sciences**, v. 13, p. 11610, 2023.

JANSEN-ALVES, C. et al. Applications of propolis encapsulation in food products. **Journal of Microencapsulation**, v. 40, n. 8, p. 567–586, 2023.

JAVED, S.; MANGLA, B.; AHSAN, W. From propolis to nanopropolis: An exemplary journey and a paradigm shift of a resinous substance produced by bees. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 5, p. 2016–2041, 2022.

JEEVANANDAM, J. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 3, p. 1050-1074, 2018.

Jl, N. et al. Fabrication and Characterization of Starch Nanohydrogels via Reverse Emulsification and Internal Gelation. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 66, p. 9326-9334, 2018.

JIANG, P. et al. Enzymatically partially hydrolyzed α -lactalbumin peptides for formation of self-assembled micelles and their application for co-encapsulation of multiple antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 12921-12930, 2018.

JUSTINO, A. B. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, p. 83-92, 2018.

KARLSEN, J. Encapsulation and other programmed/sustained-release techniques for essential oils and volatile terpenes. In: BAŞER, K. Hüsnü Can (ed.). Handbook of Essential Oils. 3. ed. **Boca Raton: Crc Press**, Cap. 17, p. 868, 2020.

KAUR, K. et al. Formulation and physicochemical study of oil-in-water nanoemulsion based on α -tocopherol stabilized with biodegradable and non-toxic surfactant: sodium stearoyl lactate. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 570-578, 2017.

KAUR, R. et al. Combating Microbial Infections Using Metal-Based Nanoparticles as Potential Therapeutic Alternatives. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 909, 2023.

- KENTISH, S. et al. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 170-175, 2008.
- KESKIN, M.; KESKIN, S.; KOLAYLI, S. Preparation of alcohol free propolis-alginate microcapsules, characterization and release property. **LWT - Food Science and Technology**, v. 108, p. 89-96, 2019.
- KHAN, A. K. et al. Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications in Drug Delivery. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, p. 131169–1177, 2014.
- KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, p. 908–931, 2019.
- KHORASANI, S.; DANAIE, M.; MOZAFARI, M. R. Nanoliposome technology for the food and nutraceutical industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 79, p. 106-115, 2018.
- KINGWATEE, N, et al. Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in Lychee juice varied carrier materials. **Food Science and Technology**, v. 62, p. 847-853, 2015.
- KUMAR, M. et al. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and Chlorophyllin on aflatoxin-B1 induced liver carcinogenesis in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p. 1006-1016, 2011.
- KUMAR, P. P. N. V. et al. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Boerhaavia diffusa* plant extract and their anti-bacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 562-566, 2014.
- KUMARI, A.; Yadav, S. K.; Yadav, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.
- KUNDU, S. et al. Silver and gold nanocluster catalyzed reduction of methylene blue by arsine in micellar medium. **Materials Science**, v. 25, p. 577-579, 2002.
- KUROZAWA, L. E.; Hubinger, M. D. Hydrophilic food compounds encapsulation by ionic gelation. **Current Opinion in Food Science**, v. 15, p. 50-55, 2017.
- LAHTINEN, S. J. et al. Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM modifies subpopulations of fecal *Lactobacilli* and *Clostridium difficile* in the elderly. **Age (Dordr)**, v. 34, p. 133-143, 2012.
- LEE, B. K.; Yun, Y.; Park, K. PLA micro- and nano-particles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 107, p. 176-191, 2016.
- LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, p. 259-269, 2007.
- LIMA, D. S. et al. Chitosan-based silver nanoparticles: A study of the antibacterial, antileishmanial and cytotoxic effects. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 32, p. 397-410, 2017.
- LIN, Y. et al. Corn protein hydrolyzate as a new nano-vehicle: improved physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of vitamin D3. **LWT-Food Science and Technology**, v. 72, p. 510–517, 2016.

LIU, F. et al. Fabrication and characterization of protein-phenolic conjugate nanoparticles for co-delivery of curcumin and resveratrol. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 450-461, 2018.

LIU, G. et al. Novel protein–lipid composite nanoparticles with an inner aqueous compartment as delivery systems of hydrophilic nutraceutical compounds. **Nanoscale**, v. 10, p. 10629-10640, 2018.

LIVNEY, Y. D. Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions. **Current Opinion in Food Science**, v. 3, p. 125-135, 2015.

LÓPEZ, B. G. C. et al. Phytochemical markers of different types of propolis. **Food Chemistry**, v. 146, p. 174-180, 2014.

LU, Y. et al. Strategies to Improve Micelle Stability for Drug Delivery. **Nano Research**, v. 11, p. 4985–4998, 2018.

LUKAWSKI, M. et al. New oral liposomal formulation of vitamin C: properties and bioavailability. **Journal of Liposome Research**, v. 30, p. 22-234, 2020.

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. e0145954, 2016.

MACIEL, M. I. S.; Souza, M. M. B. Prebióticos e probióticos - benefícios potenciais na nutrição e saúde humana. **IntechOpen**, 2019.

MAHAMUNI-BADIGER, P. P. Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 108, p. 110319, 2020.

MAHAMUNI-BADIGER, P. P. et al. Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. **Mater. Sci. Eng.**, v. 108, p. 110319, 2020.

MAHATO, K. et al. Gold Nanoparticle Surface Engineering Strategies and Their Applications in Biomedicine and Diagnostics. **3 Biotech**, v. 9, n. 2, p. 57, 2019.

MALEKHOSSEINI, S. et al. Fabrication and Characterization of Hydrocortisone Loaded Dextran-Poly Lactic-Co-Glycolic Acid Micelle. **Heliyon**, v. 6, p. e03975, 2020.

MALEKJANI, N.; JAFARI, S. M. Intelligent and Probabilistic Models for Assessing the Release of Bioactive Food Ingredients from Transporters/Nanocarriers. **Food Bioprocess Technology**, v. 15, p. 1495–1516, 2022.

MALIK, S.; MUHAMMAD, K.; WAHEED, Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. **Molecules**, v. 28, p. 661, 2023.

MARTINOVIĆ, J. et al. Physicochemical Characterization and Evaluation of Gastrointestinal In Vitro Behavior of Alginate-Based Microbeads with Encapsulated Grape Pomace Extracts. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 980, 2023.

MARTINS, B. R. et al. Immunosensor Based on Zinc Oxide Nanocrystals Decorated with Copper for the Electrochemical Detection of Human Salivary Alpha-Amylase. **Micromachines**, v. 12, p. 657, 2021.

MARTINS, E. et al. Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: Applications and drawbacks. **Journal of microencapsulation**, v. 34, p. 754-771, 2017.

MARTINS, V. C. et al. Nanotecnologia em alimentos: Uma breve revisão. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 7, p. 25-42, 2015.

MASSIRONI, A. et al. Development and Characterization of Highly Stable Silver NanoParticles as Novel Potential Antimicrobial Agents for Wound Healing Hydrogels. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 4, p. 2161, 2022.

MAZAYEN, Z. M. et al. Pharmaceutical nanotechnology: From the bench to market. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 12, 2022.

MCCLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, p. 2297-2316, 2011.

MELO, F. O.; CONSTANT, P. B. L. Microencapsulation by Ion Gelification: a technological prospection based on INPI. **Cadernos de Prospecção**, v. 14, p. 1236-1247, 2021.

MENA, E. et al. Comparative genomics of plant pathogenic *Diaporthe* species and transcriptomics of *Diaporthe caulivora* during host infection reveal insights into pathogenic strategies of the genus. **BMC Genomics**, v. 23, n. 1, p. 175, 2022.

MENA, E. et al. Soybean Stem Canker Caused by *Diaporthe caulivora*; Pathogen Diversity, Colonization Process, and Plant Defense Activation. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1733, 2020.

MENEZES, C. R. et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1309-1316, 2013.

MILANI, D. et al. Surface modification of nanoparticles for targeted drug delivery, **Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery**, v. 2019; 207-220.

MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: Application of nanotechnology in cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 15, p. 842-850, 2010.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 99-112, 2006.

MORA-HUERTAS, C. E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MORAIS, P. G. et al. Nanofilm of ZnO nanocrystals/carbon nanotubes as biocompatible layer for enzymatic biosensors in capacitive field-effect devices. **Journal of Materials Science**, v. 52, p. 12314-12325, 2017.

MOURA, F. B. R. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and wound healing effects of topical silver-doped zinc oxide and silver oxide nanocomposites. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 617, p. 121620, 2022.

MOURA, F. J. A. et al. Study of photocatalytic properties of nanoparticles of ZnO with different dopants. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.3, p. 21574-21596, 2021.

MYLLYLUOMA, E. et al. Probiotic supplementation improves tolerance to Helicobacter pylori eradication therapy - a placebocontrolled, doubleblind randomized pilot study. **AP&T**, v. 21, p. 1263-1272, 2005.

NAITO, E. et al. Beneficial effect of oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on insulin resistance in dietinduced obesity mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 650-657, 2011.

NASCIMENTO, T. G. et al. Caseinates loaded with Brazilian red propolis extract: preparation, protein-flavonoids interaction, antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 147, p. 1329–1343, 2022.

NASCIMENTO, T. G. et al. Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18293, 2019.

NASCIMENTO, T. G. et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, p. 1-16, 2016.

NASR, M. 2016. Development of an optimized hyaluronic acid-based lipid nanoemulsion that co-encapsulates two polyphenols for nose-to-brain delivery. **Drug Delivery**, v. 23, p. 1444–1452, 2016.

NASROLLAHZADEH, M. et al. Chapter 1 - An Introduction to Nanotechnology. **Interface Science and Technology**, Elsevier, v. 28, p. 1-27, 2019.

NASTITI, C. M. R. R. et al. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, p. 37, 2017.

NEDJI, N.; LOUCIF-AYAD, W. Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, p. 433-437, 2014.

NEVES, M. A.; Hashemi, J.; Prentice, C. Development of novel bioactives delivery systems by micro/ nanotechnology. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 7-12, 2015.

NIKALJE, A. P. Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Medicinal Chemistry*, v. 5, p. 81-89, 2015.

OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 1-21, 2022.

ONWULATA, C. H. Microencapsulation and functional bioactive foods. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 37, p. 510–532, 2013.

PANDEY, R. et al. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 83, p. 373-378, 2003.

PASSOS, R. M. Study of the behavior of tomato pulp microcapsules (*Lycopersicum esculentum* var. Carmen) immersed in extra virgin olive oil: product interaction and stability. **Research, Society and Development**, v. 10, 2021.

PATHAKOTI, K.; MANUBOLU, M.; HWANG, H. M. Mint: Nanostructures: current uses and future applications in food science. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 245-253, 2017.

PATHAKOTI, K.; Manubolu, M.; Hwang, H. M. Nanostructures: current uses and future applications in food science. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, p. 245-253, 2017.

- PAULO, F.; SANTOS, L. Inclusion of hydroxytyrosol in ethylcellulose microparticles: In vitro release studies under digestion conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 84, p. 104-116, 2018.
- PEREIRA, D. S. et al. Histórico e principais usos da própolis apícola. **ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v. 11, n. 2, p. 01-21, 2015.
- PEREIRA, K. C. et al. Microencapsulation and release controlled by the diffusion of food ingredients produced by spray drying: a review. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.
- PETERS, R. et al. Identification and characterization of organic nanoparticles in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 100-112, 2021.
- PFORDT, A. et al. *Trichoderma Afroharzianum* Ear Rot–A New Disease on Maize in Europe. **Frontiers in Agronomy**, v. 2, p. 547758, 29 set. 2020.
- PIRES, V. G. A.; MOURA, M. R. Preparation of new nanocomposites containing nanoemulsions of melaleuca, copaíba and lemon oil for application as biomaterial. **Química Nova**, v. 40, p. 1-5, 2017.
- RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 849-859, 2003.
- RAIZEL, R. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, v. 4, p. 66-74, 2011.
- RAJABI, H. et al. Chitosan-gum Arabic complex nanocarriers for encapsulation of saffron 67 bioactive components. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 578, p. 123644, 2019.
- RANJAN, S. et al. Nanoscience and nanotechnologies in food industries: opportunities and research trends. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, p. 1-23, 2014.
- RATTANAPAK, T. et al. Comparative study of liposomes, transfersomes, ethosomes and cubosomes for transcutaneous immunisation: characterisation and in vitro skin penetration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p. 1560-1569, 2012.
- RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76-83, 2016.
- RAZAVI, S. et al. Nanomaterial-based encapsulation for controlled gastrointestinal delivery of viable probiotic bacteria. **Nanoscale Advances**, v. 3, p. 2699–2709, 2021.
- REIS, E. M. et al. Assessment of the genotoxic potential of two zinc oxide sources (amorphous and nanoparticles) using the in vitro micronucleus test and the in vivo wing somatic mutation and recombination test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 55-63, 2015.
- REIS, FS, et al. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. **Trends in Food Science & Technology**, v. 66, p. 48-62, 2017.
- REIS, S. A. et al. Mechanisms responsible for the hypocholesterolaemic effect of regular consumption of probiotics. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, p. 36-49, 2017.

ROCHA, F. et al. Effects of *Larrea nitida* nanodispersions on the growth inhibition of phytopathogens. **AMB Express**, v. 13, n. 1, p. 98, 2023.

ROCHA, L. C. R. **Desenvolvimento de micropartículas contendo suco de tomate via gelificação iônica**. 2017. Dissertação (Mestre em Produtos e Nanoprodutos Alimentícios) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

RODRIGUES, I. F. B. D. et al. Development and Evaluation of Spheres Loaded with Red Propolis Extract and Metallic Nanoparticles using the Ionic Gelation Method. (Aguardando aceite da **Journal Apicultural Research**).

RODRIGUES, I. F. B. D.; Silva, A. C. A.; Basílio Júnior, I. D.; Silva, V. C.; Mergulhão, N. L. O. N.; Bulhões, L. C. G.; Santos, J. Microencapsulação de própolis vermelha pelo método de gelificação iônica. National invention application, utility model, invention addition certificate and entry into the national PCT phase. Patent published at INPI under number BR1020220106002, 2022.

RODRÍGUEZ, J. et al. Current encapsulation strategies for bioactive oils: from alimentary to pharmaceutical perspectives. **Food Research International**, v. 83, p. 41-59, 2016.

RUDRAMURTHY, G. et al. Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 836, 2016.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SAFRA, T. et al. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². **Annals of Oncology**, v. 11, p. 1029-1033, 2000.

SAJID, M.; Plotka-Wasyłka, J. Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. **Microchemical Journal**, v. 154, p. 104623, 2020.

SALGADO, J. Alimentos funcionais. São Paulo: **Oficina de textos**, 2017.

SALGADO, J. In: **Alimentos funcionais**. 1 ed., São Paulo: Oficina de textos, 2017.

SALMINEN, S. et al. Interaction of probiotics and pathogens - benefits to human health? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 157-167, 2010.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, C. et al. Hydrogen-Induced Reduction Improves the Photoelectrocatalytic Performance of Titania. **ACS Applied Energy Materials**, v. 7, p. 2101–2108, 2024.

SANFELICE, R. C.; PAVINATTO, A.; CORRÊA, D. S. Introdução à Nanotecnologia, p. 27-48. **Nanotecnologia Aplicada a Polímeros**. São Paulo: Blucher, 2022.

SANTIAGO, L. G.; Castro, G. R. Novel technologies for the encapsulation of bioactive food compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 78-85, 2016.

SANTOS, F. L. et al. Utilização de Probióticos na Redução da Anemia Ferropriva. **Diálogos e Ciência Revista da Rede de Ensino FTC**, v. 7, p. 13-18, 2008.

SANTOS, M. S. et al. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus* sp. Sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e agrotecnologia**, v. 27, p. 1395-1400, 2003.

SELMANI, A.; KOVAČEVIĆ, D.; BOHINC, K. Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 303, p. 102640–102652, 2022.

SERVAT, L. et al. Microencapsulation: a Promising Alternative for Preserving Natural Products. **Revista Fitos**, v. 5, p. 52-57, 2010.

Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT. Probióticos, prebióticos e simbióticos: definição, benefícios e aplicabilidade industrial, **Dossiê técnico**, 2014.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 894-9072000;

SHAIKH, A. **Demanda por probióticos cresce significativamente**. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/espaco-aberto/demanda-por-probioticos-cresce-significativamente-207775/>. Acesso em: 11 de maio de 2021.

SHARMA, G. et al. Novel development of nanoparticles to bimetallic nanoparticles and their composites: A review. **Journal of King Saud University – Science**, v. 31, p. 257–269, 2019.

SHNOUDEH, A. J. et al. Chapter 15 – synthesis, characterization, and applications of metal nanoparticles. Editor(s): Rakesh K. Tekade, In Advances in Pharmaceutical Product Development and Research, **Biomaterials and Bionanotechnology**, p. 527–612, 2019.

SILVA, A. C. A. et al. Doped Semiconductor Nanocrystals: Development and Applications. **IntechOpen**, 2021.

SILVA, A. C. A. et al. Synergistic effect of simonkolleite with zinc oxide: Physico-chemical properties and cytotoxicity in breast cancer cells. **Materials Chemistry and Physics**, v. 266, p. 124548, 2021.

SILVA, A. C. A. et al. Transition Metals Doped Nanocrystals: Synthesis, Characterization, and Applications. **IntechOpen**, 2021.

SILVA, A. S. S. et al. Fruooligossacarídeos: Fibras alimentares ativas. **Revista saúde e Ambiente**, v. 25, p. 259-304, 2007.

SILVA, I. S. M. et al. Encapsulation of Red Propolis in Polymer Nanoparticles for the Destruction of Pathogenic Biofilms. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 2, p. 49, 2020.

SILVA, P. T. et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1304-1311, 2014.

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

SILVA, S. R. S.; BRAZ, H. M. F. S. Apicultura aliada à agricultura de subsistência como processo de aprendizagem no semi-árido sergipano. Eventos, X ENFOPE – Encontro Internacional de Formação de Professores, **XI – Fórum Permanente Internacional de Inovação Educacional**. v. 8, n. 1, 2015. Disponível em: <https://eventos.set.edu.br/index.php/enfope/index>. Acesso em: 14 de abril de 2022.

SILVA, V. C. et al. New Insights for Red Propolis of Alagoas-Chemical Constituents, Topical Membrane Formulations and Their Physicochemical and Biological Properties. **Molecules**, v. 25, p. 5811, 2020.

SILVA, V. S.; Orlandelli, R. C. Desenvolvimento de alimentos funcionais nos últimos anos: Uma Revisão. **Revista Uningá**, v. 56, p. 182-194, 2019.

SOKOLONSKI, A. R. et al. Activity of antifungal drugs and Brazilian red and green propolis extracted with different methodologies against oral isolates of *Candida* spp. **BMC Complement Med Ther**, v. 21, n. 1, p. 286, 2021.

SOUSA, C. J. A. et al. Synthesis and characterization of zinc oxide nanocrystals and histologic evaluation of their biocompatibility by means of intraosseous implants. **International Endodontic Journal**, v. 47, n. 5, p. 416–424, 2014.

SOUZA, F. S. et al. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28 p. 86-97, 2010.

SOUZA, FCA, et al. Alimentos Funcionais No Manejo Do Diabetes Melitus Tipo 2: Uma Abordagem Bibliográfica. **Ciência & Saberes**, v. 3, 2017.

SOUZA, G. L. D. et al. Effects of zinc oxide and calcium–doped zinc oxide nanocrystals on cytotoxicity and reactive oxygen species production in different cell culture models. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 45, n. 4, p. e54, 2020.

SUDA, J. R. et al. Formulation and Evaluation of Sustained Release Cefadroxil Microencapsulated by Inotropic Gelation. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 12, p. 17-27, 2023.

SUN, S. et al. Pathotype diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *mungicola* causing wilt on mungbean (*Vigna radiata*). **Crop and Pasture Science**, v. 71, n. 10, p. 873, 2020.

SUNDAR, S.; PRAJAPATI, V. K. Targeted medicine for infectious diseases using nanoparticle surface functionalized with special biomolecules. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3196-3202, 2012.

SZCZYGLEWSKA, P.; FELICZAK-GUZIŁ, A.; NOWAK, I. Nanotechnology-General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles. **Molecules**, v. 28, p. 4932, 2023.

TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.

TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 303-318, 2004.

TAKIHARA, A. M. et al. Optimization of sodium alginate microcapsules and their effect on β -galactosidase activity. In: Oliveira, Ana Flávia de. **Topics in food science and technology: results of academic research**, v. 4, p. 285-311, 2019.

TAYLOR-PASHOW, K. M. L. et al. Hybrid nanomaterials for biomedical applications. **Chemical Communications**, v. 46, p. 5832-5849, 2010.

THE UNITED STATE PHARMACOPEIA, The National Formulary. **USP 36/NF 31**. Rockville: The United States Pharmacopeial convention, 2013.

- TIRLA, A. et al. New Insight and Future Perspectives on Nutraceuticals for Improving Sports Performance of Combat Players: Focus on Natural Supplements, Importance and Advantages over Synthetic Ones. **Applied Sciences**, v. 12, p. 8611, 2022.
- VALLE, A. L. et al. Application of ZnO Nanocrystals as a Surface-Enhancer FTIR for Glyphosate Detection. **Nanomaterials**, v. 11, p. 509, 2021.
- VALLE, J. A. B. et al. Chitosan microcapsules: methods of the production and use in the textile finishing. **Journal of applied polymer science**, v. 138, p. 50482, 2021.
- VANISKI, R.; CORTI, D.; DRUNKLER, D. A. Techniques and materials used in microencapsulation of probiotics. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, p. 156-184, 2017.
- VARAVALLO, M. A. et al. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, p. 83-104, 2008.
- VERMA, A. et al. Green Nanotechnology: Advancement in Phytoformulation. **Research. Medicines**, v. 6, p. 39, 2019.
- VICĂ, M. L. et al. Qualitative Characterization and Antifungal Activity of Romanian Honey and Propolis. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1552, 2022.
- VICĂ, M. L. et al. The antimicrobial activity of honey and propolis extracts from the central region of Romania. **Food Bioscience**, v. 41, p. 101014, 2021.
- VIVERO-ESCOTO, J. L.; HUANG, Y. T. Inorganic-organic hybrid nanomaterials for therapeutic and diagnostic imaging applications. *International Journal of Molecular Sciences* 12:3888-3927, 2011.
- VOGEL, H. G.; MAAS, J; GEBAUER, A. Drug discovery and evaluation: methods in clinical pharmacology. **Springer, Nanotechnology in medicine**, p. 533–546, 2022.
- WALIA, R. et al. Hydrogel–solid hybrid materials for biomedical applications enabled by surface-embedded radicals. **Advanced Functional Materials**, v. 30, 2004599, 2020.
- WANG, H.; WANG, L.; XIAO, F. S. Metal@Zeolite hybrid materials for catalysis. *ACS Central Science*, v. 6, p. 1685-1697, 2020.
- WANG, S. et al. Fortification of dietary biopolymersbased packaging material with bioactive plant extracts. **Food Research International**, v. 49, p. 80-91, 2012.
- WATHONI, N. et al. The Potential Cytotoxic Activity Enhancement of α -Mangostin in Chitosan-Kappa Carrageenan-Loaded Nanoparticle against MCF-7 Cell Line. **Polymers (Basel)**, v. 13, p. 1681, 2021
- WEISS, J. et al. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. **Food Biophysics**, v. 3, p. 146-154, 2008.
- WIERZBINSKI, K. R. et al. Potential use of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vitro and in vivo bioimaging of human myoblasts. **Scientific Reports**, v. 8, p. 3682, 2018.
- WILDMAN, REC. Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. Boca Raton: CRC Press, 2000.

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

WU, Z. et al. Hydrophobically Modified Polysaccharides and Their Self-Assembled Systems: A Review on Structures and Food Applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 284, p. 119182, 2022.

YAN, J. et al. Preparation of Puerarin Chitosan Oral Nanoparticles by Ionic Gelation Method and Its Related Kinetics. **Pharmaceutics**, v. 12, p. 216, 2020.

ZAROGOULIDIS, P. et al. Gene therapy for lung cancer malignant pleural effusion: Current and future nano-biotechnology. **Translational Lung Cancer Research**, v. 1, p. 234-237, 2012.

ZHANG, H. Y. et al. Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 618-627, 2012.