

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

LAIS FARIAS AZEVEDO DE MAGALHÃES OLIVEIRA

**Nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com extrato de própolis vermelha:
síntese, caracterização e avaliação *in vitro* da atividade antioxidante, antimicrobiana e
antiviral**

Maceió – AL

2021

LAIS FARIAS AZEVEDO DE MAGALHÃES OLIVEIRA

**Nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com extrato de própolis vermelha:
síntese, caracterização e avaliação *in vitro* da atividade antioxidante, antimicrobiana e
antiviral**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais da Universidade Federal de Alagoas como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof^o. Dr. Eduardo Jorge da Silva
Fonseca

Co-orientador: Prof^o. Dr. Ticiano Gomes do
Nascimento

Maceió – AL

2021

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

Bibliotecária: Livia Silva dos Santos – CRB-4 – 1670

O48n Oliveira, Lais Farias Azevedo de Magalhães.

Nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com extrato de própolis vermelha: síntese, caracterização e avaliação in vitro da atividade antioxidante, antimicrobiana e antiviral / Lais Farias Azevedo de Magalhães Oliveira. – 2021.

130 f.:il.

Orientador: Eduardo Jorge da Silva Fonseca.

Coorientador: Ticiano Gomes do Nascimento.

Tese (Doutorado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 111-130

1. Própolis vermelha 2. Nanopartículas. 3. Sílica mesoporosa. 4. Atividades Biológicas – Própolis. 5. Flavonoides. I. Título.

CDU: 620.3

Lais Farias Azevedo de Magalhães Oliveira

**Nanopartículas de sílica mesoporosa carregadas com extrato de própolis vermelha:
síntese, caracterização e avaliação *in vitro* da atividade antioxidante, antimicrobiana e
antiviral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência dos Materiais da Universidade Federal
de Alagoas e aprovada em 06 de setembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eduardo Jorge da Silva Fonseca (Orientador – PPGMateriais/UFAL)



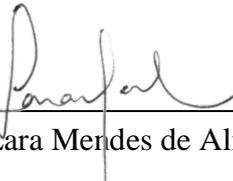
Prof. Dr. Ticiano Gomes do Nascimento (Co-orientador – ICF/UFAL)



Prof. Dr^a. Lígia Maria Manzine Costa (PPGMateriais/UFAL)



Prof. Dr^a. Maria Cristina Marcucci Ribeiro (ICT/UNESP)



Prof. Dr^a. Lara Mendes de Almeida (SBM/SP)

*“Faça o teu melhor, nas condições que você tem,
enquanto não tem condições melhores, para
fazer melhor ainda.”*

(Mário Sérgio Cortella)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, força maior que coordena, em minha concepção, o Universo o qual não temos ciência de sua dimensão. Essa energia que nos momentos alegres e difíceis me encorajada, no fundo da alma, mostrando que o propósito da vida é aprender a sermos melhores e maiores intelectual e moralmente, portanto, não cabe aqui o sentimento de imodéstia.

Ao meu esposo, Leonardo (Leo), a quem sou muito agradecida, pois me ensina todos os dias a procurar enriquecer os meus conhecimentos. Em todos os momentos que penso em desistir ele me dá forças para continuar e sempre está disposto a me apoiar em minhas escolhas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Fonseca, que me deu todo o suporte e depositou em mim confiança para concluir bem essa etapa da minha vida, sua pessoa foi de fundamental importância para o meu crescimento profissional e pessoal. Assim como, agradeço aos professores (Prof. Dr. Alcenísio e Prof. Dr. Samuel) que fazem parte do laboratório GON, que em nossas reuniões de grupo, de maneira intencional ou não, me mostraram o caminho que eu deveria percorrer para o meu melhoramento.

Igualmente agradeço ao meu co-orientador, Prof. Dr. Ticiano Gomes, que sempre se importou com o meu crescimento profissional e esteve presente na minha trajetória para indicar a melhor forma de buscar o aperfeiçoamento.

Aos meus pais, minha “maria” Sônia Maria e meu pai Rubem Azevedo, que me traduzem, em suas atitudes, o significado de ter força e sabedoria para enfrentar os desafios da vida com tranquilidade, esperança e fé em Deus.

Às minhas irmãs, Simony e Carla, que mesmo não morando mais com elas somos companheiras para todas as necessidades.

Aos meus amigos do laboratório Aninha Rúbia, Laís, Lalinha, Jenny, Sendy, Laura, Artur, Jonathas, Vitor, e aos que passaram por lá durante esses 4 anos e meio (prorrogados por causa da pandemia), obrigada por dividir comigo tantos momentos bons como os cafés, *brownies*, brigadeiros, almoços e bolos da Valéria, e, claro, trabalhos, obtenção de resultados e análises.

Aos companheiros de doutorado que colaboraram para obtenção dos resultados da minha pesquisa.

Aos professores que disponibilizaram os seus laboratórios para realização da pesquisa.

Gratidão!

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo vincular os avanços tecnológicos no ramo da nanociência com a ciência da saúde, desenvolvendo um nanocarreador para extrato da própolis vermelha utilizando nanopartículas de sílica mesoporosa do tipo MCM-41. A MCM-41 apresenta várias vantagens, como alta área superficial, grande capacidade de funcionalização, tamanho de poro ajustável, na faixa de 2 a 50 nm, possibilitando o carregamento de moléculas bioativas protegendo contra degradação, aumentando seu tempo de meia-vida e aumentando a biodisponibilidade e solubilidade. Desta forma, a própolis, que é uma substância resinosa com alto poder terapêutico, tem sido empregada popularmente nas práticas integrativas por apresentar baixa toxicidade e amplo espectro de ação, porém apresenta baixa solubilidade e biodisponibilidade. Para esse estudo, foram utilizadas amostras de extrato da própolis vermelha (EPV) do “O Cortiço”, cuja origem botânica é a *Dalbergia ecastophyllum* e *Symphonia globulifera*, da região dos manguezais do Estado de Alagoas, com o objetivo de preparar e caracterizar nanocarreadores utilizando a MCM-41. As amostras de MCM-41 e MCM-41 contendo EPV (MCM-41/Pr) foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X (DRX) de baixo ângulo, análise termogravimétrica (TG), adsorção-dessorção de N₂, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e cromatografia líquida de ultraeficiência com detecção de arranjo de diodo (UPLC-DAD). O perfil de liberação do EPV encapsulada nas nanopartículas foi avaliado em ensaio *in vitro* em tampão fosfato pH 5,5, 7,2, 7,4 e 7,6. Além disso, o teste *in vitro* para a atividade antioxidante do EPV e da MCM-41/Pr foi realizado usando o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). O ensaio *in vitro* da atividade antibacteriana pelo método de difusão em poço foi realizado contra *Staphylococcus aureus* e CIM foi determinada contra as bactérias *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*. A citotoxicidade foi avaliada em células Vero E6 pelo método do ensaio colorimétrico do MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio] e a atividade antiviral contra o vírus Chikungunya *in vitro*, a adsorção viral foi realizada por 2h em células Vero E6, seguida pelo tratamento com diferentes concentrações. A MCM-41 e a MCM-41/Pr apresentaram resultados satisfatórios com tamanho de partícula entre 100 a 300 nm, com base nas medidas de MEV e tamanho de poro de 3,63 nm, com base nos resultados de adsorção-dessorção de N₂. MCM-41 observou-se grande área superficial (1289,97 m².g⁻¹) demonstrando uma redução de mais da metade após a incorporação do EPV (549,23 m².g⁻¹). Nos resultados de DRX de baixo ângulo confirmou-se a formação de nanopartículas de sílica com estrutura hexagonal. A partir das análises de FTIR e TG pode ser observada a assimilação do EPV na estrutura mesoporosa da sílica com eficiência de ±15%. Foram identificados os seguintes compostos fenólicos por UPLC-DAD: pinobanksina, pinocembrina, daidzeína, liquiritigenina, isoliquiritigenina, formononetina, biochanina A na MCM-41/Pr mantendo-se a integridade dos constituintes da própolis vermelha e comprovando-se a eficiência de encapsulação. As análises de atividades antioxidante, antibacteriana e antiviral confirmam que suas propriedades farmacológicas foram preservadas. Conclui-se que as partículas de MCM-41 atingiram uma escala nanométrica, assim como a incorporação do EPV foi alcançada e as MCM-41/Pr se mostraram serem capazes de manter a atividade antioxidante e de agir contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e o vírus Chikungunya, possibilitando a produção futura de medicamentos e/ou cosmecêuticos para reverter quadros de algumas enfermidades.

Palavras-chaves: Própolis vermelha. Nanopartículas. Sílica mesoporosa. MEV. Atividades biológicas. Flavonoides

ABSTRACT

This work aims to join technological advances in the field of nanoscience with the health science, developing a nanocarrier for red propolis extract using nanoparticles of mesoporous silica type MCM-41. MCM-41 has several advantages, such as high surface area, large capacity of functionalization, adjustable pore size, in the range of 2 to 50 nm, allowing the carrying of bioactive molecules protecting against degradation, increasing their half-life and increasing bioavailability and solubility. Thus, propolis, which is a resinous substance with high therapeutic power, has been used popularly as in integrative practices due to its low toxicity and a wide spectrum of action, but it has low solubility and bioavailability. For this study, samples of red propolis extract (RPE) from “O Cortiço”, which is a botanical origin of *Dalbergia ecastaphyllum* and *Symphonia globulifera*, from the mangrove region of the State of Alagoas, were used with the intention of prepare and characterize nanocarriers using MCM-41. The samples of MCM-41 and MCM-41 containing RPE (MCM-41/Pr) were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), low angle X-ray diffraction (DRX), thermogravimetric analysis (TG), N₂ adsorption-desorption, scanning electron microscopy (SEM) and by ultra-efficiency liquid chromatography with diode array detection (UPLC-DAD). The release profile of RPE encapsulated in nanoparticles was evaluated *in vitro* assay in phosphate buffer pH 5.5, 7.2, 7.4 and 7.6. Likewise, the *in vitro* test for antioxidant activity of RPE and MCM-41/Pr was performed using 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil (DPPH) radical. *In vitro* test of antibacterial activity by the well diffusion method was performed against *Staphylococcus aureus* and MIC was determined against bacteria *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli*. Cytotoxicity was evaluated in Vero E6 by the [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium] (MTT) colorimetric assay method and antiviral activity against Chikungunya virus *in vitro*, viral adsorption was performed for 2h on Vero E6 cells, followed by treatment with different concentrations. The MCM-41 and MCM-41/Pr produced satisfactory results with particle size between 100 to 300 nm based on SEM measurements and pore size of 3.63 nm based on N₂ adsorption-desorption results. MCM-41 showed a large surface area (1289.97 m².g⁻¹) with a reduction of more than half after the incorporation of RPE (549.23 m².g⁻¹). In the results of low angle XRD confirmed the formation of silica nanoparticles with hexagonal structure. From the analysis of FTIR and TG, the incorporation of RPE into the mesoporous structure of silica can be observed with ± 15% efficiency. The following phenolic compounds were identified by UPLC-DAD: pinobanksine, pinocembrine, daidzein, liquiritigenin, isoliquiritigenin, formononetine, biochanin A in MCM-41/Pr maintaining the integrity of the constituents of red propolis and proving the efficiency of encapsulation. Analyzes of antioxidant, antibacterial and antiviral activities confirm that their pharmacological properties have been preserved. It is concluded that the particles of MCM-41 reached a nanometric scale, as the incorporation of RPE was achieved and MCM-41/Pr showed to be able to maintain the antioxidant activity and to act against *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* and the Chikungunya virus, enabling future production medication and/or cosmeceuticals to revert some illnesses.

Keywords: Red propolis. Nanoparticles. Mesoporous silica. MEV. Biological activities. Flavonoids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sequência de imagem do STM durante a deposição de átomos individuais de xenônio (Xe) (com altura de 1,6 Å, cada) em uma superfície de níquel (Ni).	19
Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão dos nanotubos de carbono grafítico.	20
Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão do nanotubo de carbono de folha única.....	21
Figura 4. Áreas de atuação e aplicação da nanotecnologia.	21
Figura 5. Materiais produzidos utilizado a manufatura aditiva por impressoras 3D.....	22
Figura 6. Expressão de CAIX e absorção celular em células 4T1 e Mef.....	24
Figura 7. Imageamento óptico <i>in vivo</i> da biodistribuição de SiNPs modificados injetados por via intravenosa em diferentes pontos pós-injeção: (a) imagem do abdômen e (b) imagem posterior.....	25
Figura 8. Representação das estruturas de MCM-41 (a), MCM-48 (b) e MCM-50 (c).	27
Figura 9. Mecanismo de formação da nanopartícula de sílica mesoporosa do tipo MCM-41.	30
Figura 10. Vegetação de origem da própolis vermelha. (A) <i>D. ecastaphyllum</i> ; (B) <i>S. globulifera</i> ; (C) própolis vermelha na colmeia, (D) própolis vermelha nos coletores e (E) própolis vermelha coletada.....	33
Figura 11. Estrutura molecular da (1) scrobiculatona A e da (2) scrobiculatona B.	34
Figura 12. Estrutura molecular da (1a e 1b) nemorosona, (2) xantoquimol e (3) gutiferona E.	35
Figura 13. Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.....	38
Figura 14. Composição da Própolis	40
Figura 15. Estrutura molecular dos derivados de fenilpropeno. (1) <i>trans</i> -anetol, (2) metileugenol, (3) <i>trans</i> -metiliseugenol, (4) elemicina e (5) <i>trans</i> -isoelemicina.	41
Figura 16. Isoflavonoides encontrados na própolis vermelha de Alagoas. (1) Isoflavana isosativam e (2) Pterocarpano medicarpina.....	42
Figura 17. Estrutura molecular das subclasses dos Flavonoides.	46
Figura 18. Estrutura molecular de representantes mais comuns dos flavonóis.	47

Figura 19. Estrutura molecular da apigenina e luteolina.....	48
Figura 20. Estrutura molecular da catequina e seus isômeros.....	48
Figura 21. Estrutura molecular das antocianidinas mais frequentemente encontradas na natureza.....	49
Figura 22. Rota biossintética do acetato malonato.....	53
Figura 23. Biossíntese das prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos.....	61
Figura 24. Número de casos de câncer registrados pela Organização Mundial de Saúde em 2018.	63
Figura 25. Ilustração da reação do DPPH com um dos componentes da própolis de <i>Baccharis dracunculifolia</i> , o ácido <i>p</i> -cumárico*.....	74
Figura 26. Reação de redução do MTT a Formazan.....	78
Figura 27. FTIR do (1) Extrato de propolis vermelha, (2) MCM-41 e (3) MCM-41/Pr.	81
Figura 28. Estrutura da (A) MCM-41 e (B) compostos fenólicos da própolis vermelha.	83
Figura 29. Difração de Raio-X da MCM-41.	85
Figura 30. Termograma da (1) MCM-41, (2) EPV e (3) MCM-41/Pr.	86
Figura 31. Isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio de (A) MCM-41 e (B) MCM-41/Pr.	88
Figura 32. Processo de adsorção.....	88
Figura 33. MEV da (A) MCM-41 e (B) MCM-41/Pr e seus respectivos histogramas de distribuição de tamanho de partícula.	91
Figura 34. Amostras de MCM-41 e MCM-41/Pr.....	91
Figura 35. Perfil cromatográfico da própolis vermelha usando UPLC-DAD para (A) Extrato de própolis vermelha e (B) MCM-41/Pr.....	93
Figura 36. Perfil de liberação <i>in vitro</i> dos flavonoides da própolis vermelha da MCM-41 no pH de (A) 5,5, (B) 7,2, (C) 7,4 e (D) 7,6.	96
Figura 37. Atividade antimicrobiana da (A e B) MCM-41/Pr e (C e D) extrato de própolis vermelha contra <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) pelo método de poço difusão.	100

Figura 38. Zona de inibição (mm) da MCM-41/Pr e do Extrato de própolis vermelha contra <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) pelo método de poço difusão.	101
Figura 39. Ensaio de citotoxicidade das nanopartículas contendo própolis vermelha em células Vero E6 por 72 horas pelo método colorimétrico do MTT.....	104
Figura 40. Ensaio da atividade antiviral contra o vírus Chikungunya das nanopartículas contendo EPV.....	106
Figura 41. Interação das nanopartículas de sílica porosa com os vírions do VSR.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de própolis brasileira.	32
Tabela 2. Classificação dos compostos fenólicos.	43
Tabela 3. Gradiente de eluição do solvente durante a análise UPLC-DAD.	71
Tabela 4. Concentrações dos materiais para realização do ensaio de viabilidade celular.	79
Tabela 5. Tabela da relação entre os valores das bandas de absorção e os grupos químicos encontrados na MCM-41 e no extrato de própolis vermelha.	82
Tabela 6. Dados estruturais da MCM-41 e MCM-41/Pr (S_{BET} , superfície específica; V_t , volume total poro).	89
Tabela 7. Determinação dos biomarcadores presentes na Própolis Vermelha e na MCM-41/Pr.	94
Tabela 8. Cinética de liberação <i>in vitro</i> da própolis vermelha encapsulada na MCM-41.	96
Tabela 9. Atividade antioxidante (%) do extrato da própolis vermelha e MCM-41/Pr.	98
Tabela 10. Concentração inibitória mínima (CIM) da MCM-41, MCM-41/Pr e EPV.	102

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Reação de hidrólise	29
Equação 2. Reação de condensação	29
Equação 3. Equação de pseudo primeira ordem.....	733
Equação 4. Equação de pseudo segunda ordem	733
Equação 5. Atividade antioxidante (%)	755
Equação 6. Viabilidade celular (%)	799
Equação 7. Inibição viral (%).....	80

LISTA DE ABREVIACOES

4T1	Linhagem de células tumorais mamária de camundongo
ACP	Proteína Carreadora de Acilas (do inglês: <i>Acyl Carrier Protein</i>)
ADP	Difosfato de Adenosina
AFM	Microscópio de Força Atmica (do inglês: <i>Atomic Force Microscope</i>)
AgNPs	Nanoprculas de Prata
ATP	Trifosfato de Adenosina
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
CAIX	Anidrase Carbnica IX
CC	Controle Celular
CHIKV	Vírus Chikungunya
CMC	Concentrao Micelar Crítica
CMNT	Concentrao Máxima N Tóxica
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxygenase
CTA ⁺	Cátion Cetiltrimetilamnio
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamnio
DMSO	Dimetilssulfxido
DNA	cido Desoxirribonucleico (do inglês: <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DOX	Doxorrubicina
DPPH	Radical (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)
DRX	Difraco de Raio-X
EDX	Espectroscopia de Raio X por Energia Dispersiva
ELISA	Ensaio de Imunoabsoro Enzimática (do inglês: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPV	Extrato de Própolis Vermelha
FAS	cido Graxo Sintetase (do inglês: <i>Fatty Acid Synthase</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
G ₀	Fase de repouso

G ₁	Fase de primeiro gap, síntese proteica
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (do inglês: <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>)
HIV	Vírus de Imunodeficiência Humana (do inglês: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance (do inglês: <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
IBM	<i>International Business Machines</i>
IC	Concentração Inibitória
ISO-TC	<i>International Organization for Standardization – Technical Committee</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
M41S	<i>Mobil 41 Synthesis</i>
MCM-41	<i>Mobil Composition of Mater N° 41</i>
MCM-41/Pr	MCM-41 com própolis vermelha
MCM-48	<i>Mobil Composition of Mater N°48</i>
MCM-50	<i>Mobil Composition of Mater N°50</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIC	Concentração Inibitória Mínima (do inglês: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MSNs	Nanopartículas de Sílica Mesoporosas (do inglês: <i>Mesoporous Silica Nanoparticles</i>)
MTT	[3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio]
NADP	Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B (do inglês: <i>Nuclear Factor kappa B</i>)
NO	Óxido Nítrico
NP	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEG	Polietilenoglicol
PEGMA	Metacrilato de Polietilenoglicol (do inglês: <i>Poly(ethylene glycol) methacrylate</i>)
PGD ₂	Prostaglandina D ₂

PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGES	Prostaglandinas
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLGA	Poli(Ácido Lático co-Glicólico)
PVA	Própolis Vermelha de Alagoas
RNA	Ácido Ribonucleico (do inglês: <i>Ribonucleic Acid</i>)
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio (do inglês: <i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com coluna de Fase Reversa (do inglês: <i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i>)
RP-HPTLC	Cromatografia de Camada Fina de Alta Eficiência com coluna de Fase Reversa (do inglês: <i>Reverse Phase High Performance Thin Layer Chromatography</i>)
SBA-15	<i>Santa Barbara Amorphous N°15</i>
SBA-16	<i>Santa Barbara Amorphous N°16</i>
SiNPs	Nanopartículas de Sílica
STM	Microscópio de Corrente por Tunelamento (do inglês: <i>Scanning Tunneling Microscope</i>)
TEOS	Tetraetilortosilicato
TG	Termogravimetria
TMOS	Tetrametilortosilicato
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês: <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Ultraeficiência com Detector de Arranjo de Diodo (do inglês: <i>Ultra Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection</i>)
UV-vis	Ultravioleta-visível
VSR	Vírus Sincicial Respiratório

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO LITERÁRIA	17
2.1 Nanociência	17
2.2 Nanotecnologia	18
2.3 Nanobiotecnologia	23
2.3.1 Nanopartículas de sílica mesoporosas (MSNs)	26
2.3.2 Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosas do tipo MCM-41	28
2.4 Própolis	31
2.5 Propólis vermelha	33
2.6 Metabólitos secundários	36
2.7 Composição química da própolis	38
2.7.1 Composição química da própolis vermelha.....	41
2.7.2 Compostos fenólicos.....	43
2.7.2.1 Flavonoides	45
2.7.2.2 Ácidos fenólicos.....	51
2.7.2.3 Derivados dos ácidos graxos.....	51
2.8 Atividades biológicas da própolis	54
2.8.1 Atividade antimicrobiana	55
2.8.2 Atividade antiviral.....	57
2.8.3 Atividade antioxidante.....	59
2.8.4 Atividade anti-inflamatória.....	60
2.8.5 Atividade anticancerígena	62
2.8.6 Atividade leishmanicida	65
3 OBJETIVOS	67
3.1 Objetivo geral	67
3.2 Objetivos específicos	67
4 MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.1 Materiais	68
4.2 Métodos	68

4.2.1 Síntese das nanopartículas de sílica mesoporosas do tipo MCM-41	68
4.2.2 Processo de adsorção do EPV pela MCM-41	68
4.3 Caracterização	69
4.3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	69
4.3.2 Difração de Raios-X de Baixo Ângulo (DRX).....	69
4.3.3 Termogravimetria (TG).....	69
4.3.4 Isotermas de Adsorção-Dessorção de Nitrogênio	70
4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	71
4.3.6 Análise por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência (UPLC-DAD).....	71
4.3.7 Ensaio de Dissolução MCM-41/Pr	72
4.4 Atividade Biológica <i>In vitro</i>	74
4.4.1 Atividade Antioxidante do EPV e MCM-41/Pr pelo método DPPH	74
4.4.2 Atividade Antibacteriana de EPV e da MCM-41/Pr	75
4.4.3 Viabilidade Celular	77
4.4.4 Atividade Antiviral Contra o Vírus Chikungunya	79
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	81
5.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	81
5.2 Difração de Raio-X de Baixo Ângulo (DRX).....	84
5.3 Análise Termogravimétrica (TG)	85
5.4 Isotermas de Adsorção-Dessorção de Nitrogênio.....	87
5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	90
5.6 Cromatografia Líquida de Ultraeficiência (UPLC-DAD)	92
5.7 Ensaio de Dissolução MCM-41/Pr.....	95
5.8 Atividade Antioxidante do EPV e MCM-41/Pr pelo método DPPH	97
5.9 Atividade Antibacteriana de EPV e da MCM-41/Pr	99
5.10 Viabilidade Celular	103
5.11 Atividade Antiviral Contra o Vírus Chikungunya	105
6 CONCLUSÕES.....	110
REFERÊNCIAS.....	111

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia resultante da manipulação e caracterização de materiais em escala nanométrica é definida como nanotecnologia, a qual vem impulsionando o crescimento econômico, tecnológico e científico em vários setores, tais como: computacional, energético, ambiental, automobilístico, biomédico e outros (ZHANG, WANG et al., 2003; RÓZ, LEITE et al., 2015).

No setor biomédico, permite o desenvolvimento de materiais e equipamentos com a finalidade de melhorar e aumentar a expectativa de vida (MITRAN, DEACONU et al., 2019). A nanociência aplicada a área da medicina tem possibilitado a fabricação de uma variedade de nanomateriais multifuncionais visando inúmeras aplicações. Como relatado em estudos anteriores, nanopartículas de sílica mesoporosa (MSNs) estão sendo usadas em vários setores relevantes da biologia/nanomedicina, como imageamento celular (ZHAO, QIN et al., 2012), diagnóstico, bioanálise, entrega de drogas com baixa solubilidade e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade visando minimizar os efeitos adversos e aumentar a eficácia dos medicamentos (YANG, CHEN e SHI, 2019).

A MCM-41 é um tipo de MSNs que possui arranjo hexagonal uniforme de seus canais mesoporosos unidimensionais, com diâmetro na faixa de 2-50 nm de acordo com a recomendação da IUPAC (SLOWING, VIVERO-ESCOTO et al., 2010; WU, MOU e LIN, 2013). As MCM-41 têm sido bastante utilizadas pois possuem ótimas vantagens como, alta área de superfície (WU, MOU e LIN, 2013), elevada capacidade de funcionalização (SAROJ e RAJPUT, 2018; SZEGEDI, POPOVA et al., 2012; KERMANNEZHAD, CHERMAHINI et al., 2016), tamanho de poro ajustável que possibilita o carregamento de moléculas bioativas conferindo estabilidade adicional protegendo-as contra degradação (POPOVA, SZEGEDI et al., 2014) e excelente monodispersidade (TANG, LI e CHEN, 2012; LU, LIONG et al., 2010). Além disso, as MSNs apresentam estabilidade química, térmica e alta biocompatibilidade (LV, ZHANG et al., 2016; AZEVEDO, SILVA et al., 2018).

Dessa forma, esses nanomateriais podem ser um ótimo carreador para bioproduto que, normalmente apresentam baixa biodisponibilidade devido à sua baixa solubilidade em água e que são facilmente oxidados, podendo ter sua vida útil aumentada pela proteção que fornecem (POPOVA, LAZAROVA et al., 2018).

O uso de plantas medicinais, produtos fitoterápicos e opoterápicos vem atraindo interesse da comunidade científica devido às evidências científicas de suas propriedades

farmacológicas benéficas como agente anti-inflamatório, anticâncer, antioxidante, antibacteriano, antiviral e antifúngico (WANG, ZHAO et al., 2015; YUAN, MA et al., 2016).

Dentre os opoterápicos encontra-se a própolis que é uma substância resinosa complexa produzida pelas abelhas (*Apis mellifera*) a partir de exsudatos coletados de diferentes partes das plantas, as abelhas acrescentam, a essas substâncias, secreções salivares e enzimas dando como produto final a própolis (DO NASCIMENTO, SILVA et al., 2016; CUI e DUKE, 2015). Este produto é utilizado pelas abelhas em diferentes aplicações tais como barreira natural de proteção contra insetos, microrganismos invasores e no reparo das colmeias (BANKOVA, DE CASTRO e MARCUCCI, 2000; MARCUCCI, 1996)

A própolis vermelha do Brasil pode ser encontrada em diferentes estados litorâneos brasileiros em região de mangues como Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, entre outros. Essa substância apresenta diversas propriedades biológicas e sua composição química sofre influências das condições ambientais e da biodiversidade presente no local de coleta das abelhas (PARK, IKEGAKI e DE ALENCAR, 2000).

Em geral, a literatura relata que a composição química da própolis consiste em aproximadamente 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera e o restante de óleos essenciais e aromáticos, pólen e outras substâncias (TOMAZZOLI, ZEGGIO et al., 2020; DE VARGAS, LOGUERCIO et al., 2004; DO NASCIMENTO, ARRUDA et al., 2019). Mais de 300 componentes foram relatados em amostras de própolis vermelha, as quais foram analisadas por diversas técnicas (MARTINI, BARBOSA et al., 2017). A classe mais importante de compostos farmacologicamente ativos na própolis vermelha são flavonoides, isoflavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, xantonas, propolonas e gutiferas (MARTINI, BARBOSA et al., 2017; DOS SANTOS, MUNARI et al., 2019; BANSKOTA, TEZUKA et al., 1998).

Esta composição rica em resinas e ceras faz da própolis uma substância com baixa solubilidade e, conseqüentemente, baixa biodisponibilidade e esta desvantagem pode ser superada através de associação a um sistema nanocarreador. Portanto, baseando nas vantagens das nanopartículas de sílica e da própolis vermelha, esse trabalho, teve como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas mesoporosas de sílica do tipo MCM-41 carregadas com extrato de própolis vermelha visando aumentar a disponibilidade e solubilidade da própolis. Por fim, foram avaliadas suas propriedades terapêuticas através de ensaios da atividade antioxidante, antibacteriana e antiviral.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 Nanociência

O prefixo *nano*, de origem grega, significa “anão”, hoje vem sendo utilizada para descrever escalas de comprimentos físicos que representam um bilionésimo de um metro, ou seja, 1×10^{-9} m ($1 \text{ nm} = 0,0000000001 \text{ m} = 10 \text{ \AA}$) (RÓZ, LEITE et al., 2015).

O termo nanociência se destacou em 1959 quando o professor físico teórico americano Richard Feynman em uma palestra visionária com título “*There is plenty of room at the bottom*” (Há muito espaço lá embaixo) para a *American Physical Society* abordou pela primeira vez o tema da nanociência quando previu a litografia por feixe de elétrons, técnica utilizada nos tempos atuais para a produção de *chips* de silício. Assim como, também relatou a possibilidade de construir circuitos em nanoescala, utilizados hoje na produção de computadores (RÓZ, LEITE et al., 2015; POOLE JR. e OWENS, 2003).

Feynman também mencionou que seria possível colocar todos os 24 volumes da Enciclopédia Britânica na área da cabeça de um alfinete que teria 1/25.000 do seu tamanho normal, no qual poderia ser lida com técnicas de uso comum. Com essa visão extraordinária de Feynman iniciou-se o estudo do entendimento da matéria em escala nanométrica (FEYNMAN, 2010).

A nanociência estuda, especificamente, a manipulação de materiais nanométricos e os fenômenos que ocorrem nesses sistemas, nos quais há características físico-químicas que são únicas aos materiais nessa escala, quando comparada aos mesmos materiais que se encontram na escala microscópica ou macroscópica (BINNS, 2010).

Por exemplo, em um sistema nanométrico até 50% dos átomos podem estar na superfície da nanoestrutura. Quando se fala dos mesmos materiais em escala micrométrica ou macrométrica, as disposições dos átomos em sua superfície são bem menores, de tal modo que nos nanomateriais há um aumento considerável da área de superfície de contato com o meio (LINDSAY, 2010). Zhang, Wang et al. (2003) afirmam que os materiais nanométricos apresentam propriedades físico-químicas únicas que podem estar em função do tamanho, forma e estrutura cristalina desses materiais.

A alteração das propriedades físico-químicas das nanopartículas em comparação com a partícula existente na escala usual em partes é explicada pela alteração da mecânica quântica da partícula manipulada ao passo que quando há alteração no tamanho da partícula a distância dos elétrons positivos do núcleo também é alterada, trazendo enormes mudanças em suas

propriedades mecânicas, elétricas, ópticas, entre outras (PRASAD e BANDYOPADHYAY, 2014).

Assim, a nanotecnologia permite a manipulação e ajustes finos nos materiais para obtê-los com as propriedades mecânicas, elétricas e ópticas desejadas, e então, permite o desenvolvimento de materiais com propriedades únicas que podem ser utilizados em diversas áreas.

2.2 Nanotecnologia

Em 1974, surgiu o termo *nanotecnologia* criado pelo japonês, então professor da *Tokyo Science University*, Norio Taniguchi para definir a capacidade de se desenvolver e/ou manipular a matéria em nanoescala (LINDSAY, 2010).

O Comitê Técnico da Organização Internacional de Padronização (ISO-TC, do inglês *International Organization for Standardization – Technical Committee*), com a proposta de regulamentar, definiu o termo nanotecnologia em: “Compreensão e controle da matéria e processos em escala nanométrica, em geral (mas não exclusivamente) abaixo de 100 nm em uma ou mais dimensões, em que o aparecimento de fenômenos ligados ao tamanho geralmente permite novas aplicações” (RÓZ, LEITE et al., 2015; FAROKHZAD e LANGER, 2009).

Apesar do termo nanotecnologia ter surgido há pouco mais de 50 anos, a existência dos materiais nanométricos na natureza ocorrem desde que a vida apareceu na Terra, no entanto, o conhecimento da capacidade de manipulá-los e das suas diferentes propriedades físico-químicas foi sendo ampliado gradativamente com o avanço da ciência e da tecnologia (RÓZ, LEITE et al., 2015).

Desde a Idade Média (século V – XV) a humanidade já fazia uso de materiais em nanoescala mesmo sem o conhecimento de sua existência e desconhecendo que as características físicas dos materiais manipulados se davam pelo seu tamanho nanométrico. Exemplo disso, é a produção de vitrais realizada com compostos inorgânicos moídos, como o ouro (Au) e o cobre (Cu), antes de serem misturados à massa de vidro em fusão, que resultava em um pó com partículas de diferentes tamanhos nanométricos. Essa mistura de tamanhos resultava aos materiais uma variedade de cores (POOLE JR. e OWENS, 2003; ZHANG, DASARI et al., 2015). Gustav Mie (1908) em seus estudos foi o primeiro a correlacionar a cor dos vidros aos tamanhos e aos tipos de metais utilizados.

Outro exemplo da presença de nanopartículas encontra-se na tecnologia utilizada nas fotografias entre o século XVIII e XIV, onde, de maneira geral, halogenetos de prata (Ag), em

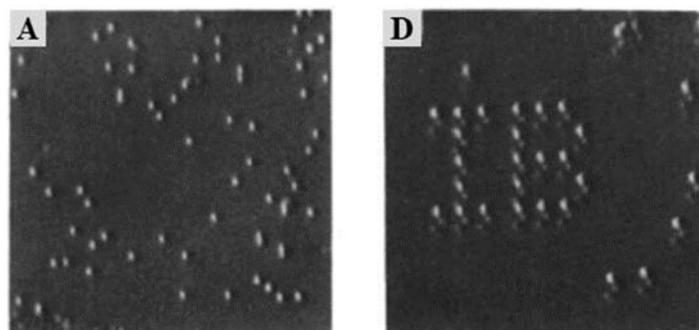
contato com a luz, decompunham-se formando nanopartículas de Ag que, por conseguinte, geravam a imagem (POOLE JR. e OWENS, 2003).

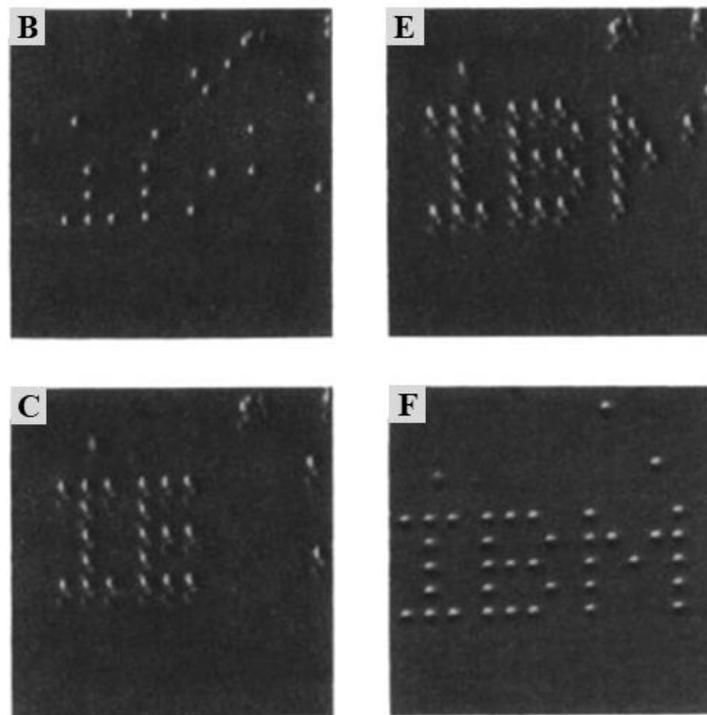
Foi devido ao desenvolvimento das técnicas que permitem visualizar os materiais em escala reduzida que a nanotecnologia começou a se desenvolver, mais precisamente em 1931 com o surgimento do microscópio eletrônico transmissão (MET) apresentado pelo físico Ernst Ruska e seus colaboradores. Esse microscópio utiliza feixe de elétrons para resolução das imagens, permitindo aumento de 300.000x ou mais para a maior parte dos materiais sólidos e resolução na ordem de 1 a 5 nm aproximadamente. Após 55 anos Ernst Ruska recebeu o Prêmio Nobel de Física, em 1986. Após 4 anos do surgimento do MET, M. Knoll descreveu a concepção do microscópio eletrônico de varredura (MEV), no qual foi construído pela primeira vez em 1938 por von Ardenne adaptando bobinas de varredura ao MET (RAMSDEN, 2011; Plataforma de Microscopia Eletrônica, 2021).

No início da década de 1980 foi inventado o microscópio de tunelamento (STM) por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer, os quais foram contemplados com o Prêmio Nobel de Física em 1986. O STM permitiu a criação de imagem na escala nanométrica e a manipulação dos átomos. No mesmo ano, surgiu o microscópio de força atômica (AFM), que permite que os materiais isolantes possam ser resolvidos na escala atômica e, dessa forma, o bioquímico Ned Seeman, pode montar a molécula de DNA (LINDSAY, 2010).

Em 1990, D. M. Eigler e E. K. Schweizer fizeram deposição de átomos individuais de xenônio (Xe) em uma placa metal de níquel (Ni), que foi previamente tratada com pulverizações catódicas de íons-argônio aquecidos utilizando uma pressão parcial de oxigênio para remoção dos carbonos da superfície para escrever as siglas IBM (*International Business Machines*) usando o STM em um sistema de ultravácuo e uma temperatura muito baixa de 4K (-269°C) (Figura 1) (EIGLER e SCHWEIZER, 1990).

Figura 1. Sequência de imagem do STM durante a deposição de átomos individuais de xenônio (Xe) (com altura de 1,6 Å, cada) em uma superfície de níquel (Ni). (A) superfície de Ni com os átomos de Xe depositados. (B) – (F) processo de construção das siglas IBM. Cada letra tem 50 Å de cima a baixo.

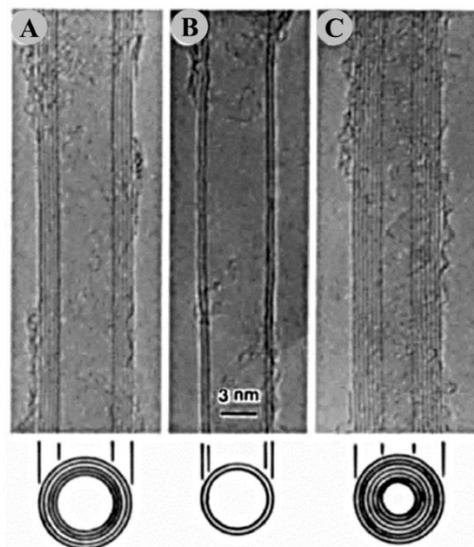




Fonte: Eigler e Schweizer (1990).

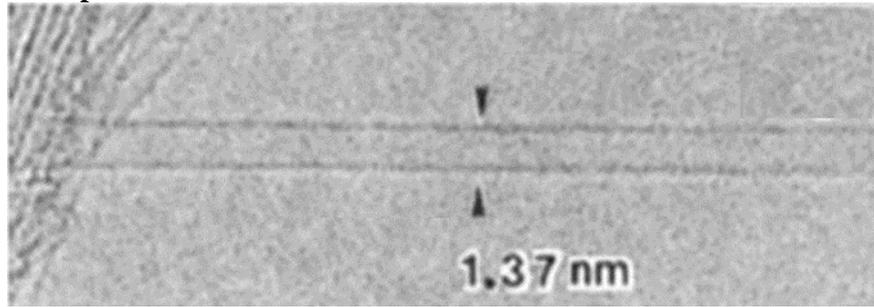
Os nanotubos de carbono foram sintetizados pela primeira vez em 1991 por Sumio Iijima (Figura 2), usando um método semelhante ao utilizado na obtenção do fulereno (IIJIMA, 1991). Dois anos depois Iijima e Ichihashi cultivaram nanotubos de carbono de folha única, com 1,37 nm de diâmetro como mostra a Figura 3 (IIJIMA e ICHIHASHI, 1993).

Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão dos nanotubos de carbono grafítico. (A) nanotubo contendo 5 folhas grafíticas, 6,7 nm de diâmetro; (B) Nanotubos com 2 folhas, 5,5 nm de diâmetro; (C) Nanotubos com 7 folhas, diâmetro de 6,5 nm (tubo menor 2,2 nm).



Fonte: Iijima (1991).

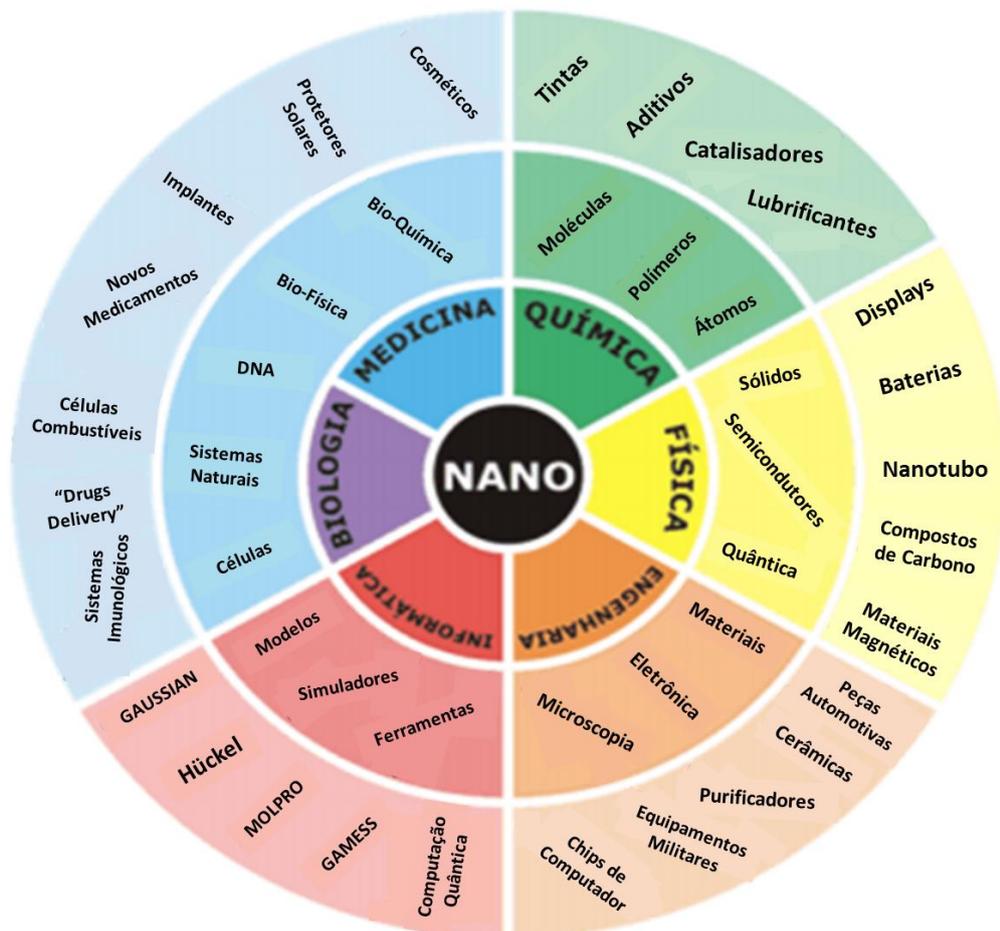
Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão do nanotubo de carbono de folha única.



Fonte: Iijima e Ichihashi (1993).

A nanotecnologia abrange as técnicas que permitem a produção, caracterização e aplicação de estruturas, equipamentos e sistemas através do controle do tamanho e forma da matéria na escala nanométrica. A produção de materiais nessa escala vem impulsionando o crescimento econômico, tecnológico e científico em vários setores, tais como: setor computacional, setores energéticos, ambientais, automobilísticos, biomédicos e outros (Figura 4) (ZHANG, WANG et al., 2003; RÓZ, LEITE et al., 2015).

Figura 4. Áreas de atuação e aplicação da nanotecnologia.



Fonte: Ferreira (2015).

A nanotecnologia aplicada na área eletrônica permitiu o desenvolvimento de vários materiais com habilidades mecânicas, topográficas e físicas através da manufatura aditiva de impressora 3D e 4D capaz de depositar sequencialmente jatos de diferentes tipos de tintas condutoras, dielétricas ou semicondutoras em uma variedade de substratos como papel, vidro e polímeros. As impressoras 4D com capacidade de ajustar o comportamento elétrico, mecânico e de rádio-frequência do material impresso permitiu desenvolver antenas reconfiguradas inspiradas em orimagi, mais leves, compactas e com alta frequência que pôde ser aplicada em áreas como aeronáutica, biomedicina e estruturas mecânicas implantáveis (Figura 5) (EID, HESTER et al., 2019).

Figura 5. Materiais produzidos utilizado a manufatura aditiva por impressoras 3D.



Fonte: Adaptado de Kettermann (2018); Cit (2018); Aeroin (2016) e Jr (2020).

2.3 Nanobiotecnologia

Processos e manipulação da matéria em nível molecular direcionados para a produção de materiais, substâncias e produtos aplicados a área biológica são chamados de nanobiotecnologia (TOMAR, JYOTI e KAUSHIK, 2020).

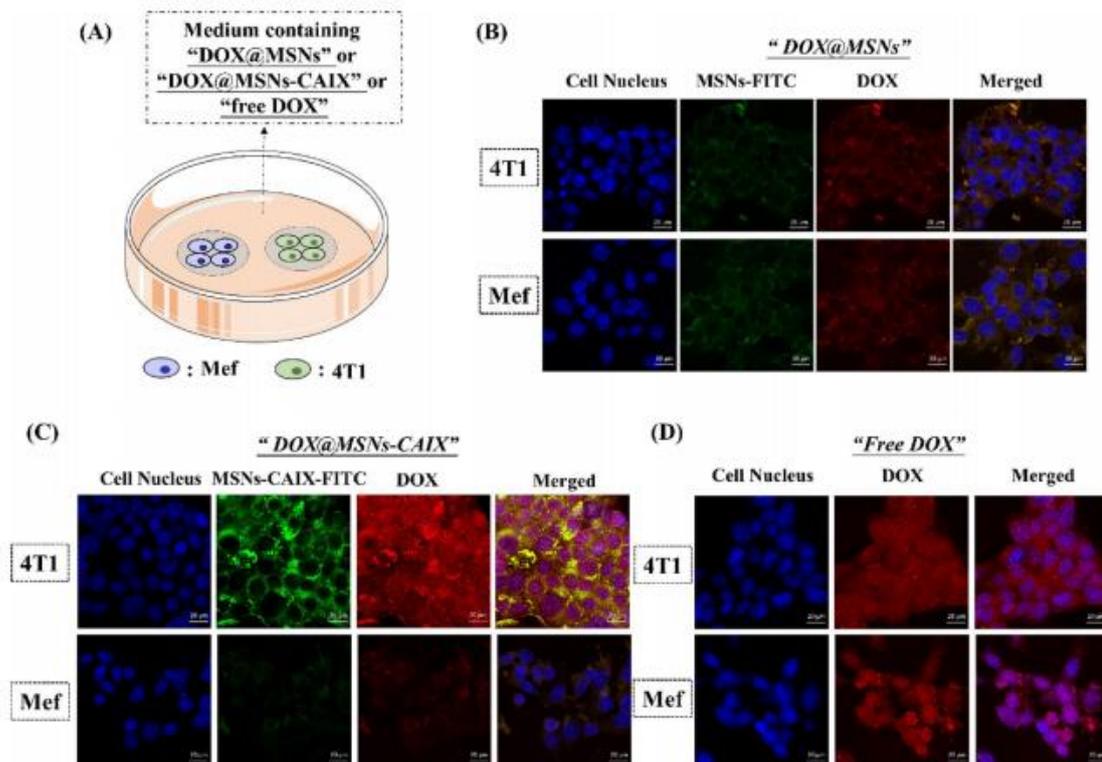
Dispositivos e materiais biomédicos/farmacêuticos estão sendo amplamente desenvolvidos utilizando processos nanotecnológicos em busca de novas ferramentas na área de detecção e diagnóstico, visando a melhoria na qualidade de vida da sociedade. Além disso, desenvolver formas de tratamento mais eficaz, contribuirão para o crescimento da expectativa de vida (ZHANG, WANG et al., 2003; MITRAN, DEACONU et al., 2019).

Brusentsov, Nikitin et al. (2002), desenvolveram nanopartículas magnéticas de ferrita dextrana para o tratamento de tecidos tumorais por hipotermia em camundongos. Foi observado que após múltiplas aplicações direcionadas ao tecido tumoral, seguido do tratamento com campo magnético, podem alcançar a regressão completa do tumor.

Segundo Farokhzad e Langer (2009) o primeiro trabalho utilizando sistema de liberação controlada com polímeros para entrega de macromoléculas, foi descrito em 1976. No decorrer dos anos, os sistemas foram sendo aprimorados, como exemplo, para ser responsivos a modificações do pH do meio desencadeando a liberação do princípio ativo. Nos últimos anos, foram desenvolvidos muitos nanomateriais e nanodispositivos biomédicos, com a intenção de melhorar a biodisponibilidade dos medicamentos, que consiste na quantidade de princípio ativo que consegue atingir o sítio alvo e promover a ação terapêutica. Ao aumentar a biodisponibilidade dos medicamentos, conseqüentemente, reduz os efeitos colaterais, uma vez que a dose necessária para atingir o efeito desejado será menor e terá entrega direcionada ao sítio específico (MAMAEVA, SAHLGREN e LINDÉN, 2013).

Chen, Hu et al. (2020) produziram um sistema de entrega de fármaco direcionado responsivo à reações redox. O sistema é composto de nanopartículas de sílica mesoporosas (MSNs) com função de carrear a doxorubicina (DOX), fármaco usual em terapias oncológicas e anidrase carbônica IX (CAIX), que é uma proteína transmembranária de superfície celular, com baixa expressão em tecidos normais e alta expressão em vários tumores sólidos. A DOX@MSNs-CAIX foi injetada em camundongos com tumor mamário da linhagem 4T1 para se avaliar o direcionamento e o efeito terapêutico. O efeito esperado foi alcançado onde DOX@MSNs-CAIX apresentou maior interação com as células tumorais (4T1) em comparação as células sadias (Mef) e a DOX na forma livre e MSNs contendo apenas a DOX (Figura 6).

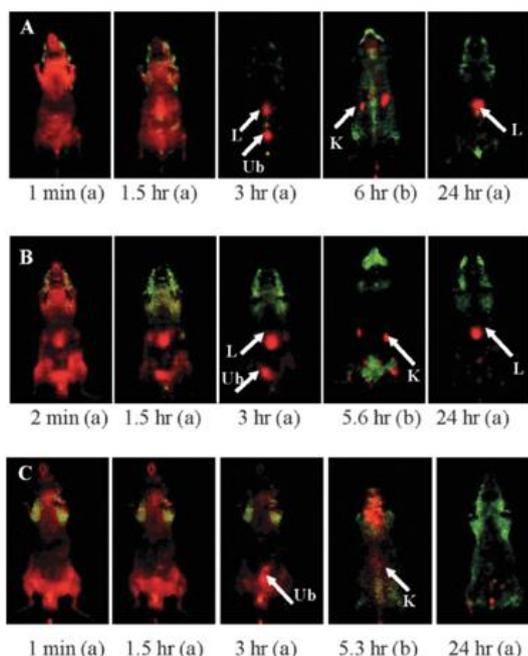
Figura 6. Expressão de CAIX e absorção celular em células 4T1 e Mef. (A) Ilustração de co-cultura de células 4T1 e Mef com DOX@MSNs, DOX@MSNs-CAIX e DOX, respectivamente. Imagens de Microscopia de varredura a laser confocal de células 4T1 e Mef cultivadas com (B) DOX@MSNs, (C) DOX@MSNs-CAIX, (D) DOX. Azul: coloração do núcleo da célula por DAPI. Verde: MSNs-CAIX rotulado por FITC. Vermelho: DOX.



Fonte: Chen, Hu et al. (2020).

Vivero-Escoto, Huxford-Phillips e Lin (2012) relataram o uso de nanopartículas de sílica funcionalizadas com corantes como agentes de contraste para imagens biomédicas e aplicações teranósticas, que apresentam função terapêutica e diagnóstica. Nesse artigo de revisão os autores mostram a biodistribuição por meio de imageamento óptico de três amostras de nanopartículas de sílica (OH-SiNPs, COOH-SiNPs e PEG-SiNPs) dopadas com o fluoróforo tris(2,2'-bipiridil)diclororutenio (II) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$). Como o polímero, polietilenoglicol (PEG), é amplamente utilizado para aumentar a biocompatibilidade e o tempo de circulação sanguínea evitando a adsorção inespecífica de proteínas. O estudo mostrou que o PEG-SiNPs exibiu um tempo na circulação sistêmica maior ($t_{1/2} = 180 \pm 40$ min) e captação mínima pelo sistema macorfangocítico nos órgãos (Figura 7).

Figura 7. Imageamento óptico *in vivo* da biodistribuição de SiNPs modificados injetados por via intravenosa em diferentes pontos pós-injeção: (a) imagem do abdômen e (b) imagem posterior. (A) OH-SiNPs, (B) COOH-SiNPs, (C) PEG-SiNPs. As setas indicam a localização do rim (K), fígado (L) e bexiga urinária (Ub).



Fonte: Vivero-Escoto, Huxford-Phillips e Lin (2012).

Estudos realizados com nanomateriais biodegradáveis e biocompatíveis como um sistema de encapsulação para extratos de plantas medicinais foram propostos com o objetivo de vencer a baixa biodisponibilidade que as substâncias bioativas presentes nos produtos vegetais normalmente apresentam (JAIN e CHELLA, 2020). Como exemplo, tem-se os flavonoides, terpenoides e taninos, que apesar de apresentarem alta solubilidade em água possuem baixa permeabilidade em membrana lipídica. Desta forma, a nanoestrutura foi proposta não apenas como melhoria da disponibilização do bioativo para a células, mas também como estabilidade do produto vegetal e como estratégia de entrega ao sítio-alvo específico, pela possibilidade de funcionalização das estruturas nanométricas utilizadas. Os estudos apontaram que os extratos vegetais apresentaram melhores respostas quando associados às nanopartículas do que na forma livre (BONIFÁCIO, DA SILVA et al., 2014).

Outro estudo foi realizado em 2008 com extrato de cúrcuma (*Curcuma longa*) em um sistema nanométrico de polietilenoglicol, também com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade da curcumina, visto que apresenta boas ações biológicas, mas possui baixa biodisponibilidade após a administração oral. Este estudo mostrou que pacientes tinham que ingerir, por via oral, 8000 mg de curcumina por dia, para atingir níveis sistêmicos detectáveis, quantidade muito elevada com baixa aceitação terapêutica. Com o intuito de desenvolver um

medicamento parenteral com a curcumina, aproveitando a sua capacidade terapêutica anticancerígena, foi desenvolvido um sistema com nanopartículas poliméricas e avaliadas contra células humanas de câncer pancreático o qual apresentou um efeito um pouco mais elevado que o da própolis na sua forma livre (BISHT, FELDMANN et al., 2007).

Uma pesquisa também objetivando otimizar a biodisponibilização dos bioativos presentes na própolis foi realizada pela encapsulação do extrato de própolis de álamo (*Populus sp.*) da Bulgária em MSNs do tipo MCM-41 e SBA-15 funcionalizadas com nanopartículas de prata. O sistema nanocarreador possibilitou uma potencialização das atividades biológicas não só pelo melhoramento da biodisponibilização da própolis como também por um efeito sinérgico das propriedades terapêuticas da própolis com o poder antimicrobiano da nanopartícula de prata (POPOVA, LAZAROVA et al., 2018).

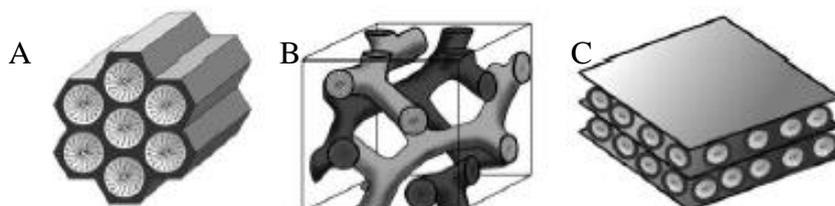
As MSNs vêm sendo utilizadas extensivamente em várias áreas de pesquisas, desde as áreas da tecnologia de sensores, sistemas adsorptivos, catalíticos como também nas áreas biomédicas e farmacêuticas. Estes materiais possuem a grande vantagem de ser biocompatíveis, possibilitando o desenvolvimento de fármacos usando esse material em sua formulação e, também, por apresentarem grande área superficial (em torno de $1000 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) permitindo carrear além da substância biologicamente ativa como também funcionalizar materiais que direcionem o fármaco para o sítio de ação desejado e/ou com materiais luminescentes que ajudem a detectar, por exemplo, células tumorais e assim tendo além da ação terapêutica, a ação de diagnóstico, que são os materiais chamados de teranósticos. Em 2011, esses materiais foram aprovados para ensaios clínicos em humanos na fase I do desenvolvimento de medicamentos ou materiais com funções fisiológicas pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, por apresentarem biocompatibilidade (FRÖBA, HOFFMANN et al., 2006; DA SILVA, 2015; MITRAN, DEACONU et al., 2019; BAEZA e VALLET-REGÍ, 2018).

2.3.1 Nanopartículas de sílica mesoporosas (MSNs)

As MSNs são sólidas, porosas, formadas a partir de silicato ou de aluminossilicato. Desenvolvidos pela primeira vez pela equipe de pesquisa da *Mobil Oil Corporation – Mobil Research and Development Corporation* em 1992, denominados M41S (do inglês, *Mobil 41 Synthesis*). Apresentam sistema de poros bem ordenados com distribuição bem definida, são materiais amorfos com tamanho de poro entre 2 – 10 nm. Os M41S são classificados de acordo com o arranjo dos poros na estrutura, que podem ser hexagonais, são as chamadas de MCM-41

(grupo espacial $p6mm$), arranjo cúbico, que são as MCM-48 ($1a3-d$) e as de estrutura laminares, chamadas de MCM-50 ($p2$) (Figura 8). A sigla MCM é proveniente da *Mobil Composition of Matter* (FRÖBA, HOFFMANN et al., 2006; DA SILVA, 2015).

Figura 8. Representação das estruturas de MCM-41 (a), MCM-48 (b) e MCM-50 (c).



Fonte: Fröba, Hoffmann et al. (2006).

Outro grupo de pesquisa da Universidade da Califórnia também desenvolveu nanopartículas de sílica mesoporosas, que são denominados de SBA-n, sigla referente à cidade Santa Bárbara, EUA, onde a SBA-15 possui estrutura hexagonal, equivalente a estrutura da MCM-41, porém, esta apresenta tamanhos de poros menores que as da SBA-15. O mesmo grupo de pesquisa também desenvolveu a SBA-16 com estrutura cúbica, equivalente a MCM-48. O tamanho de poros dessas nanopartículas estão na faixa de 2 – 30 nm. Diferem das M41S pois sua síntese além de ocorrer em pH ácido também utiliza um copolímero tribloco como modelo para direcionamento da sua estrutura (DA SILVA, 2015).

Segundo as definições da IUPAC os materiais são classificados como materiais mesoporosos por apresentarem diâmetros de poro entre 20 a 500 Å (2 a 50 nm). Materiais que apresentam tamanhos de poro menores que 2 nm são classificados como materiais microporosos, e como exemplo tem-se as zeólitas, enquanto os materiais macroporosos são aqueles que possuem diâmetro dos poros maior que 50 nm, exemplo destes são as cerâmicas. Os poros desses materiais são monodispersos, ou seja, apresentam, aproximadamente, o mesmo tamanho por toda a estrutura. Além disso, são facilmente ajustáveis com pequenas alterações nos parâmetros de seus processos de síntese (MITRAN, DEACONU et al., 2019).

Os materiais mesoporosos são sintetizados de maneira semelhante às zeólitas, porém, por esses apresentarem tamanhos de poros maiores e, dessa forma, possibilitarem a adsorção de moléculas mais volumosas na sua estrutura interna são bastante aplicados como carreadores de produtos terapêuticos (DA SILVA, 2015).

As nanopartículas de sílica mesoporosas têm sido bastante empregadas em aplicações biomédicas também pela sua capacidade de multifuncionalidade explorando a capacidade destes materiais tanto como sistema de entrega de fármacos como diagnósticos de doenças (LI,

BARNES et al., 2012). Uma das grandes dificuldades do desenvolvimento de nanocarreadores para entrega de fármacos é a capacidade de encapsular o bioativo em uma quantidade suficiente para obter uma liberação ativa, outro ponto é conseguir levar o nanocarreador ao local de ação desejado frente as dificuldades de múltiplas barreiras fisiológicas *in vivo* (TANG, LI e CHEN, 2012), tais como proteínas que formam uma espécie de coroa envolta da nanopartícula quando esta é fornecida por aplicação sistêmica (BAEZA e VALLET-REGÍ, 2018).

Também deve ser levada em consideração a toxicidade dos nanomateriais, que deve estar bem estabelecida para garantir segurança à saúde humana. E ainda, deve-se avaliar a viabilidade econômica e a produção em grande escala (TANG, LI e CHEN, 2012). Dessa forma, as nanopartículas de sílicas mesoporosas podem ser uma ótima escolha devido as suas vantagens de multifuncionalização, grande área superficial, simples produção, escalonáveis e economicamente viáveis (BAEZA e VALLET-REGÍ, 2018; FARJADIAN, ROOINTAN et al., 2019).

A biodegradabilidade das MSNs é maior que as das partículas não porosas, devido à maior área superficial apresentada que proporciona um aumento do contato com o meio biológico tanto pela face externa como na parte interna e, então, a boa dispersão coloidal facilita a deterioração do material (MITRAN, DEACONU et al., 2019) sendo acelerada ou retardada através da funcionalização destas partículas (BAEZA e VALLET-REGÍ, 2018). A degradação das MSNs é considerada relativamente rápida, tendo como principal produto o ácido silícico, um composto não tóxico (BAEZA e VALLET-REGÍ, 2018).

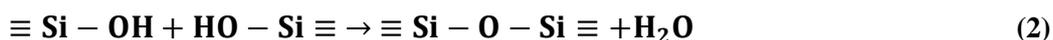
Para que as MSNs sejam carreadoras ideais para medicamentos, os tamanhos de partículas precisam ser uniformes, o volume de poros deve ser grande tal qual o seu diâmetro deve ser do tamanho adequado àquele da partícula que deseja ser carreada. Esses parâmetros são ajustados durante o processo de síntese (NARAYAN, NAYAK et al., 2018).

2.3.2 Síntese de nanopartículas de sílica mesoporosas do tipo MCM-41

O método de obtenção das MSNs é conhecido como método Stöber, que foi o pioneiro no desenvolvimento de reações para a produção de partículas esféricas de sílica em tamanhos micrométricos. Com o avanço dos estudos nessa linha de materiais foram feitas algumas modificações nos parâmetros utilizados por Stöber adaptando-o para atingir modelos diferentes e com tamanhos menores de partículas, monodispersas e ordenadas. A síntese das MSNs pode ser realizada em meio ácido, básico ou neutro, esse é um dos parâmetros que influenciam na forma geométrica das partículas (NARAYAN, NAYAK et al., 2018; SAROJ e RAJPUT, 2018).

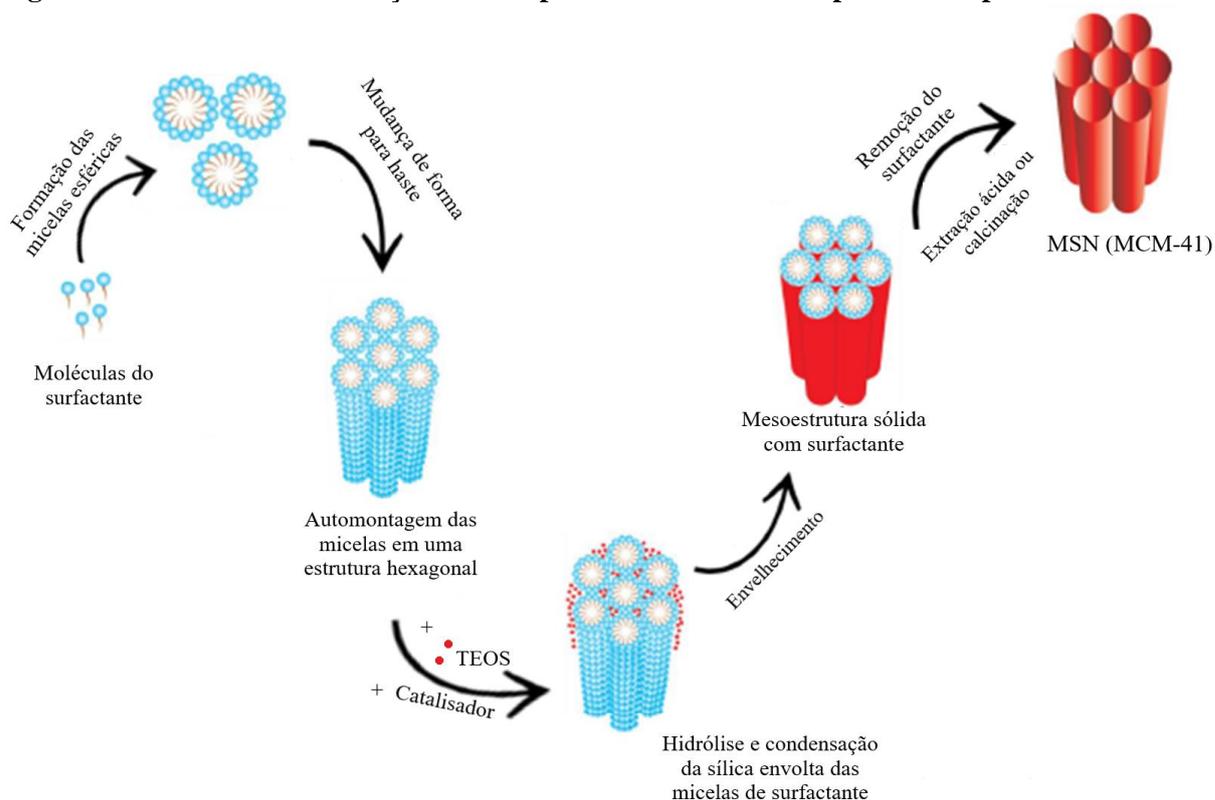
A síntese do grupo de materiais M41S ocorre em meio aquoso de pH alcalino ($\text{pH} > 8$). O modelo esférico de MCM-41 foi produzido pela primeira vez por Grun e colaboradores após realizarem modificação no processo de síntese pela introdução do surfactante catiônico, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), como o agente direcionador de estrutura (NARAYAN, NAYAK et al., 2018).

A síntese ocorre tipicamente pelo método de sol-gel, a baixas temperaturas, envolvendo a hidrólise [eq. (1)] e a condensação [eq. (2)] de um precursor de sílica na forma líquida (SALVIANO, 2017; GAN, ZHU et al., 2015). Utilizando-se um surfactante como agente direcionador da estrutura e um precursor da sílica, tal como tetraetilortossilicato (TEOS) e tetrametilortossilicato (TMOS) (FRÖBA, HOFFMANN et al., 2006).



As MSNs do tipo MCM-41 geralmente são sintetizadas usando um surfactante catiônico de cetiltrimetilamônio (CTA^+) como o agente direcionador de estrutura e em meio alcalino para o favorecimento da formação de estruturas esféricas. Esse sistema permite que o surfactante catiônico forme micelas carregadas positivamente e, dessa forma, interagem eletrostaticamente com a carga negativa da estrutura inorgânica, neste caso o silicato (Figura 9) (MITRAN, DEACONU et al., 2019). Em água, acima da concentração micelar crítica (CMC) os surfactantes formam micelas, onde a fração hidrofóbica (cauda) se orienta para o lado interno da micela e a fração hidrofílica (cabeça) forma a parte externa (SALVIANO, 2017).

Figura 9. Mecanismo de formação da nanopartícula de sílica mesoporosa do tipo MCM-41.



Fonte: Adaptada de Narayan, Nayak et al. (2018); Förba, Hoffmann et al. (2006).

A formação e a forma estrutural dos poros, como dimensão, geometria depende da formação das micelas e da interação eletrostática entre estas e as estruturas inorgânicas, permitindo a automontagem (ZHANG, WANG et al., 2003; FRÖBA, HOFFMANN et al., 2006). O tamanho dos poros é desenhado pelo tamanho da molécula do surfactante utilizado, sendo esse maior, conseqüentemente, os poros que serão formados terão tamanhos maiores quando comparados aos poros formados com surfactantes que apresentam cadeias mais curtas (ZHANG, WANG et al., 2003). A razão molar entre o surfactante e o precursor de sílica influencia no tamanho das partículas e na estabilidade da solução coloidal (WU, MOU e LIN, 2013; GAN, ZHU et al., 2015).

A fonte de sílica é a unidade de construção da estrutura sólida da MCM-41, formando como se fosse uma espécie de casca envolta das micelas de surfactante que, após a automontagem, assume um arranjo hexagonal (LI, BARNES et al., 2012). A última etapa para a obtenção da MCM-41 é a remoção do surfactante, que normalmente ocorre por meio de calcinação ou por extração ácida (Figura 9) (FRÖBA, HOFFMANN et al., 2006; WU, MOU e LIN, 2013).

Uma das vantagens dessa técnica é a possibilidade de sintetizar uma grande variedade de materiais porosos, bem como controlar tamanho e distribuição de tamanho de poros, em

função dos parâmetros da síntese, como variação do pH (FRÖBA, HOFFMANN et al., 2006), temperatura, solvente, tipo de surfactante (LI, BARNES et al., 2012), entre outros (SALVIANO, 2017).

2.4 Própolis

A própolis (origem grega, *pro* = em defesa de e *polis* = cidade ou comunidade) é uma substância resinosa, de mistura complexa, produzida por abelhas. Através da coleta de exsudatos de plantas ou parte da planta como folhas, frutos, brotos ou cascas, as abelhas levam esse material em suas patas traseiras, especificamente nas corbículas, até a colmeia, onde enriquecerão esse material com componentes das próprias secreções salivares, enzimas, resultando na formação da própolis como produto final (FREIRES, DE ALENCAR e ROSALEN, 2016; BREYER, 1980).

As abelhas utilizam a própolis para proteger a colmeia contra microrganismos e insetos invasores, para mumificar insetos que por ventura adentrem na colmeia, evitando a decomposição e contaminação do meio. Também utilizam-na para isolamento térmico, umidade e vento, para reparar a estrutura física quando ocorrem danos internos ou externos e preparar um local asséptico para a postura da abelha rainha (BREYER, 1980; CASTALDO e CAPASSO, 2002; ANDRADE, DENADAI et al., 2017).

Esse produto natural vem sendo utilizado pela humanidade de diversas formas desde antes de Cristo. Data-se, aproximadamente no ano 300 a.C., que os egípcios utilizavam a própolis para a conservação dos corpos no processo de mumificação e os sacerdotes daquela época já tinham o conhecimento do seu poder curativo, utilizando-a na medicina popular (FREIRES, DE ALENCAR e ROSALEN, 2016; BANSKOTA, TEZUKA et al., 1998; LUSTOSA, GALINDO et al., 2008).

Na Grécia e em Roma, médicos como Aristóteles, Plínio e Galeno conheciam as propriedades cicatrizantes e antissépticas dessa substância. Enquanto que os Incas, tinham o conhecimento do seu poder antipirético (CASTALDO e CAPASSO, 2002; SFORCIN e BANKOVA, 2011; MOREIRA, DIAS et al., 2011).

Na França, tem registro literários do termo própolis, datados do século XVI. Posteriormente, no século subsequente, a própolis entrou para a lista oficial de substâncias medicamentosas da Farmacopeia de Londres e a partir de então começou a ficar conhecida por toda Europa por sua atividade antibacteriana. Mais recentemente, em algumas guerras como na

Segunda Guerra Mundial (1939 – 1945) foi utilizada pelo seu poder cicatrizante (CASTALDO e CAPASSO, 2002; MARCUCCI, 1996).

Desde essa época, os estudos relacionados a essa substância foram crescendo com o objetivo de aumentar o conhecimento da relação entre o amplo espectro de ação e sua composição química. Recentemente, vários produtos vêm sendo desenvolvidos em diversos setores industriais como biomédicos, alimentos e bebidas, cosméticos e produtos odontológicos como enxaguantes e cremes bucais (FREIRES, DE ALENCAR e ROSALEN, 2016; AZEVEDO, SILVA et al., 2018). No Brasil, os estudos com a própolis datam da década de 1980 quando foi lançado o livro "Abelhas e saúde" da autoria de Ernesto Ulrich Breyer relatando a utilização da própolis como antibiótico natural (LUSTOSA, GALINDO et al., 2008).

A partir de alguns desses estudos foi descoberto que existem tipos diferentes de própolis classificadas segundo sua composição química, que variam devido à alguns fatores ligados à coleta das abelhas, tais como: origem geográfica, propriedades físico-químicas do local de coleta, sazonalidade e origem botânica (BANKOVA, DE CASTRO e MARCUCCI, 2000).

No Brasil, se conhece alguns tipos de própolis classificadas a partir de três fatores: origem botânica, coloração e origem geográfica como mostra na (Tabela 1). (TRUSHEVA, POPOVA et al., 2006; SILVA, ROSALEN et al., 2008; DAUGSCH, MORAES et al., 2008).

Tabela 1. Tipos de própolis brasileira.

Própolis encontradas no Brasil			
Origem botânica	Nome popular	Cor	Origem da própolis
<i>Populus sp</i>	Álamo, choupo	Marrom	Região Sul
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Alecrim do campo	Verde	Região Sudeste
<i>D. ecastaphyllum</i>	Rabo de bugio, marmelo do mangue, feijão de guaiamum	Vermelha	Região Nordeste
<i>S. globulifera</i>	Anani,		

Fonte: Adaptada de Park, Ikegaki e de Alencar (2000); Vasconcelos, Costa et al. (2014); Jonh (2016); Ccana-Ccapatinta, Mejía et al. (2020).

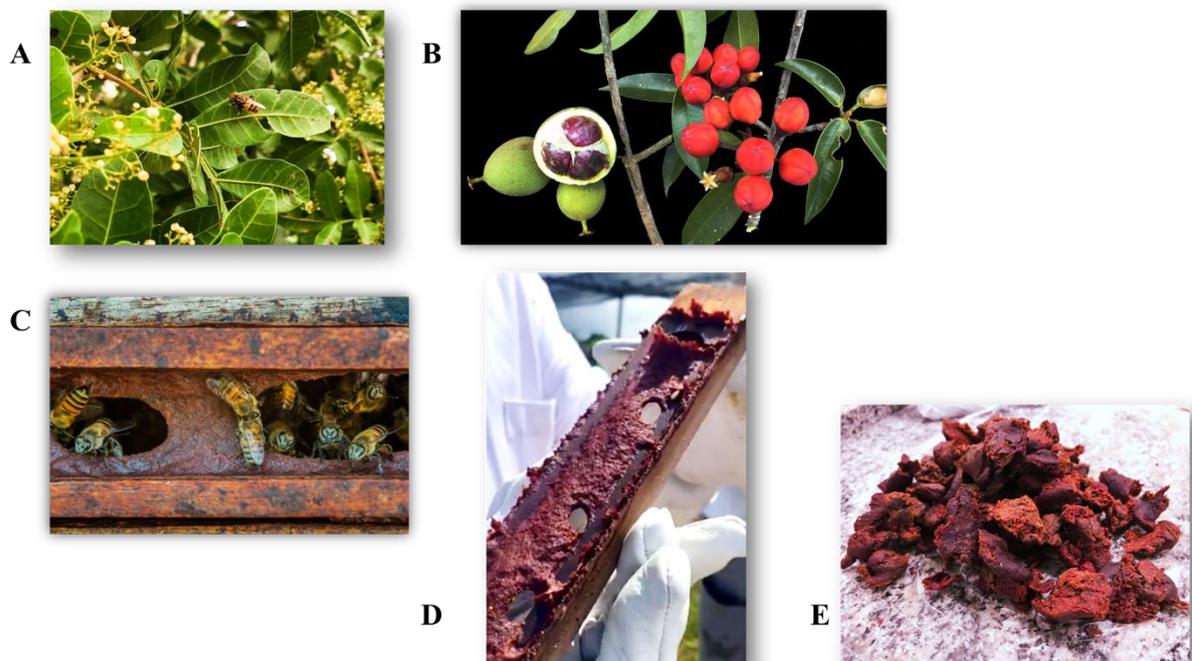
A variedade de própolis no Brasil se dá devido à sua biodiversidade, pois é sabido que a variação das condições climáticas na região de coleta, a parte da planta onde a substância é coletada e a origem botânica influenciam na sua composição química e, conseqüentemente, na sua propriedade medicamentosa. Essa variedade desperta o interesse em estudos relacionados

às propriedades farmacológicas e sua origem, ajudando a classificar as substâncias majoritárias presentes em cada tipo de própolis (TRUSHEVA, POPOVA et al., 2006).

2.5 Propólis vermelha

A própolis vermelha pode ser encontrada na região de mangues, como já foi mencionando anteriormente, lagoas, rios e praias do Nordeste do Brasil, especificamente na Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba. As abelhas desta região coletam o exsudato resinoso avermelhado liberado pela seiva da planta de origem botânica *Dalbergia ecastaphyllum* (L) Taub. (Leguminosae), popularmente conhecida como rabo de bugio e a seiva da *Symphonia globulifera* L.f. (Clusiaceae), onde são encontradas as benzofenonas polipreniladas (gutiferona E) e produzem um material resinoso de cor vermelha como mostrado na Figura 10 (DAUGSCH, MORAES et al., 2008; CAVENDISH, SANTOS et al., 2015 (CCANA-CCAPATINTA, MEJÍA et al., 2020).

Figura 10. Vegetação de origem da própolis vermelha. (A) *D. ecastaphyllum*; (B) *S. globulifera*; (C) própolis vermelha na colmeia, (D) própolis vermelha nos coletores e (E) própolis vermelha coletada.



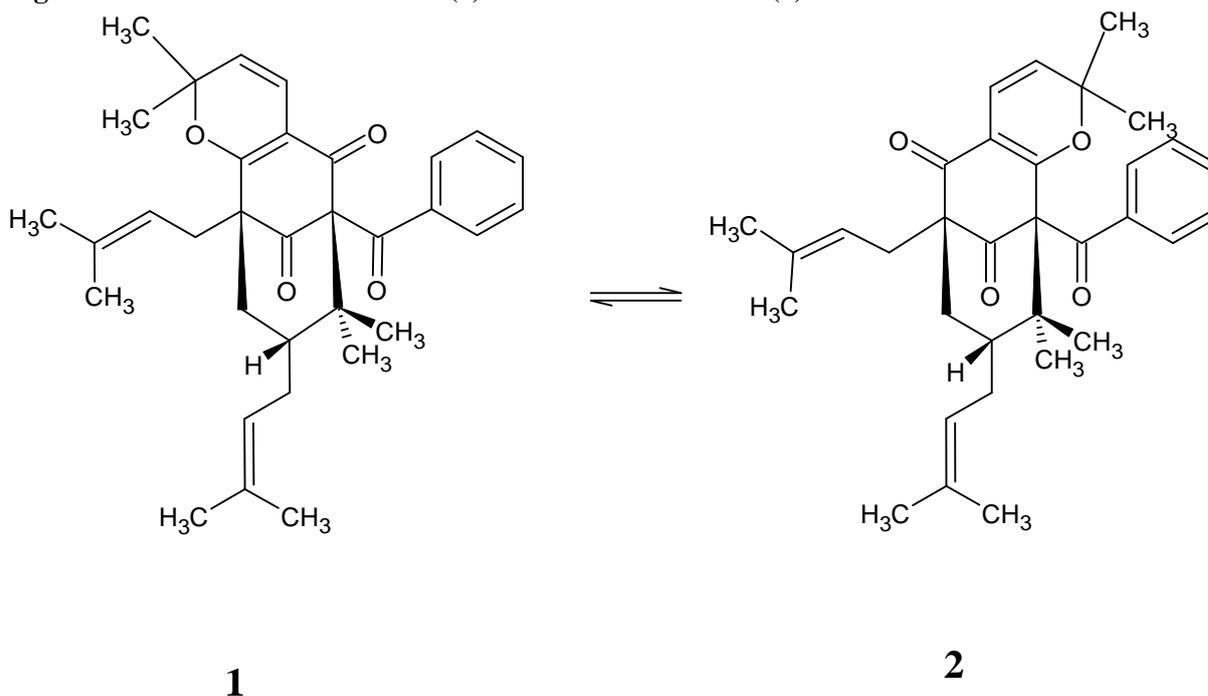
Fonte: Adaptada de Programa Arboretum (2019), Beeva Brazil (2021).

Esse tipo de própolis tem despertado interesse dos pesquisadores tanto pela pigmentação diferenciada das demais já estudadas, quanto pela semelhança com a própolis vermelha de

Cuba, que possui isoflavonoides em sua composição química (DAUGSCH, MORAES et al., 2008) e da Venezuela, que apresenta benzofenonas preniladas (TRUSHEVA, POPOVA et al., 2004).

A própolis vermelha de Cuba e da Venezuela são originadas a partir da coleta de exsudatos da *Clusia nemorosa* e *Clusia scrobiculata*, respectivamente, pertencentes à família, Clusiaceae (TRUSHEVA, POPOVA et al., 2006). Trusheva, Popova et al. (2004), após realizar estudo com extrato etanólico da própolis venezuelana em HPLC, notaram que esta possui benzofenonas poli-isopreniladas que podem ser encontradas também na resina floral do gênero *Clusia*, confirmando sua origem botânica. Nesse estudo, os autores conseguiram isolar 5 benzofenonas, dentre elas encontram-se majoritariamente, a scrobiculatona A e a scrobiculatona B (Figura 11).

Figura 11. Estrutura molecular da (1) scrobiculatona A e da (2) scrobiculatona B.



Fonte: Trusheva, Popova et al. (2004).

Além disso, também realizaram estudos da atividade antimicrobiana do extrato e da mistura dessas substâncias isoladas (1+2) contra *Staphylococcus aureus*, demonstrando que o extrato apresentou maior atividade antimicrobiana quando comparado com a mistura, mas que a mistura também demonstrou resultado satisfatório. Para a ação redutora de radicais livres, a mistura das substâncias isoladas apresentou redução de apenas 10% contra 62% de atividade do extrato.

própolis, o que despertou o interesse para estudos comparativos da composição química desta própolis e da vegetação, em busca da possível origem botânica do material coletado pelas abelhas para produzi-la (TRUSHEVA, POPOVA et al., 2006).

Sabe-se que os isoflvanoides ocorrem quase que exclusivamente na família Leguminosae e a busca, então, se deu em torno da vegetação a qual pertence essa família (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003; DAUGSCH, MORAES et al., 2008). No ano de 2007 dois trabalhos foram realizados com o objetivo de estabelecer a origem botânica da própolis vermelha. Em um dos trabalhos realizados por Dausch, Moraes et al. (2008) observaram que as abelhas faziam coleta principalmente dos exsudatos vermelho de ramos da *D. ecastaphyllum*, dos quais fizeram coleta para análise comparativa com o extrato da própolis. Os cromatogramas realizados por RP-HPTLC e RP-HPLC da própolis e do exudato da *D. ecastaphyllum* mostraram o mesmo perfil qualitativo e quantitativo de flavonoides e outros compostos químicos, como os isoflvanoides, daidzeína, formononetina e biochanina A.

O segundo trabalho realizado por Silva e colaboradores (2008), também com o mesmo objetivo, relatou os resultados de análises de composições químicas de 20 tipos de plantas retiradas da região de mangue do Estado de Alagoas, na cidade de Marechal Deodoro, para fins comparativos com as substâncias químicas presentes no extrato da própolis vermelha, essa análise foi realizada por UV-Vis, RP-HPTLC, RP-HPLC e GC-MS quando foi possível identificar que sua origem botânica principal é a *D. ecastaphyllum*.

No ano de 2020 um grupo de pesquisa realizou um estudo avaliando a origem das benzofenonas polipreniladas presentes na própolis vermelha que até então não se conhecia a sua origem botânica. A partir de análises fitoquímicas e cromatográficas confirmou-se que as substâncias liquiritigenina, isoliquiritigenina, formononetina, vestitol, neovestitol, medicarpina e 7-*o*-neovestitol são provenientes da *D. ecastaphyllum* e as benzofenonas polipreniladas (gutiferona E, oblongifonila B) e os triterpenoides (amirina e glutinol) são derivadas da *S. globulifera* (CCANA-CCAPATINTA, MEJÍA et al., 2020).

2.6 Metabólitos secundários

O metabolismo vegetal é dividido em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário é conjunto de reações químicas (síntese, conversão ou degradação) que ocorrem intermitentemente nas células de todos os seres vivos a partir de substâncias comuns a todos, como açúcares, ácidos graxos, aminoácidos e nucleotídeos, para formar substâncias mais complexas que são essenciais à vida. Essas reações de síntese, conversão e degradação

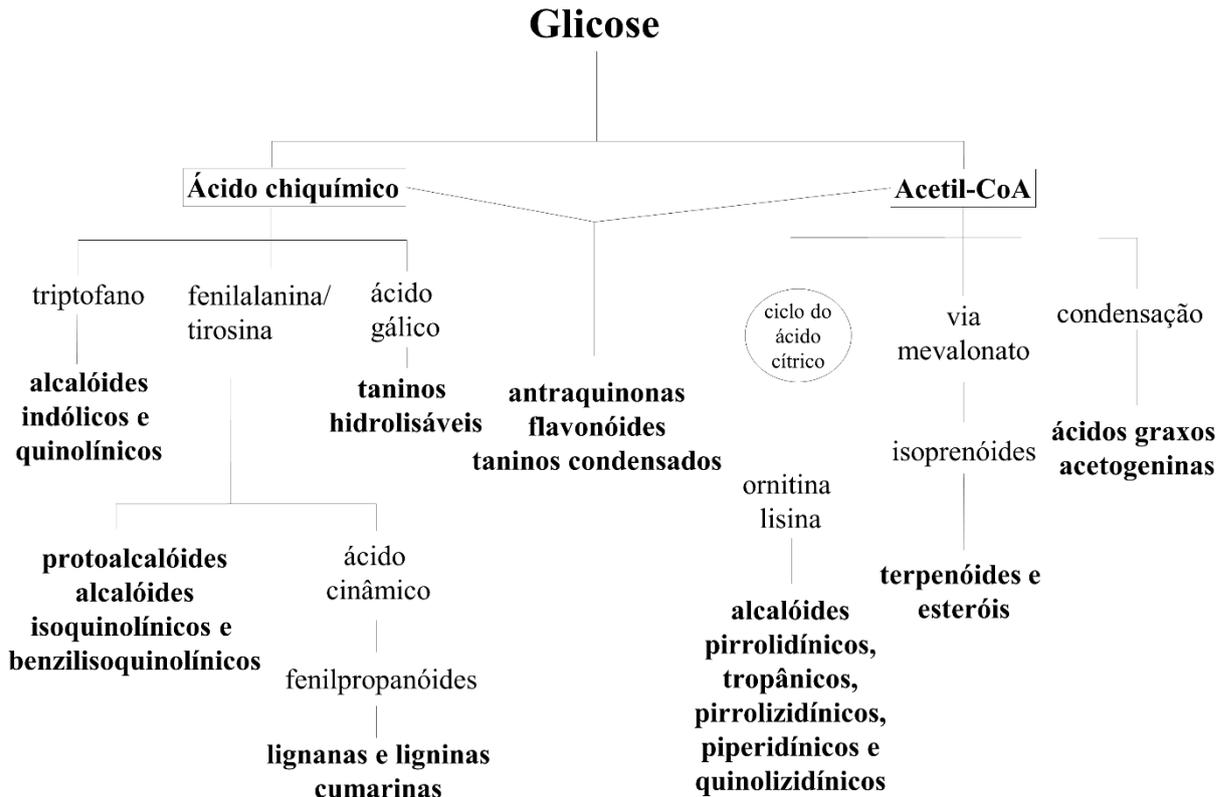
são realizadas para produzir energia, poder redutor, a partir de reações de oxido-redução dos compostos orgânicos, e as macromoléculas, como os carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. As vias metabólicas que envolvem a formação dessas macromoléculas são conhecidas como glicólise e ciclo do ácido carboxílico, também conhecido como ciclo de Krebs (MEYER, REZENDE et al., 2012; DA SILVA e CABRAL, 2017; DOS SANTOS, 2003; DE REZENDE, ROSADO et al., 2016).

No metabolismo secundário as substâncias produzidas não são essenciais de forma direta para a manutenção da vida do organismo produtor, portanto, não estão envolvidas no processo de gerar energia e/ou na constituição do protoplasma. Assim como, não estão distribuídas para todas as plantas de forma ubíqua, dessa forma, expressam a individualidade de famílias, gêneros e, até mesmo, de espécies. Os metabólitos secundários são importantes para os organismos que as produzem por darem a eles proteção contra os ataques de herbívoros, patógenos, alelopatia, protegem contra radiação UV e poluição, atraem polinizadores e dispersores, portanto, são substâncias importantes para a sobrevivência e perpetuação das espécies no ecossistema. Acredita-se que os metabolismos secundários talvez sejam ativados apenas em alguns estágios do crescimento e desenvolvimento ou durante alguma situação de estresse (DOS SANTOS, 2003; MEYER, REZENDE et al., 2012; DA SILVA e CABRAL, 2017; DE REZENDE, ROSADO et al., 2016).

A quantidade de metabólitos secundários identificados em espécies de angiospermas já passa de 50 mil. Eles são substâncias consideradas princípios ativos existentes em plantas, ou seja, são as substâncias medicamentosas encontradas nas plantas, porém, dependendo da quantidade administrada pode causar efeito tóxico ao invés de terapêutico (DOS SANTOS, 2003; DA SILVA e CABRAL, 2017; DE REZENDE, ROSADO et al., 2016).

A Figura 13 mostra a origem dos metabólitos secundários, resumidamente, partindo do metabolismo da glicose, sendo o ácido chiquímico e o acetato os dois principais intermediários (DOS SANTOS, 2003). Existem quatro rotas biossintéticas para a formação dos metabólitos secundários: 1. rota do acetato malonato; 2. rota do ácido mevalônico; 3. rota do metileritritol fosfato; e 4. rota do ácido chiquímico (DE REZENDE, ROSADO et al., 2016).

Figura 13. Rotas biossintéticas dos metabólitos secundários.



Fonte: dos Santos (2003).

O ácido chiquímico é originário de uma reação de condensação aldólica entre dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. Esse pode ser metabolizado em ácido gálico e ácido corísmico, que se tornam ácidos ionizados no pH das células da planta (DOS SANTOS, 2003).

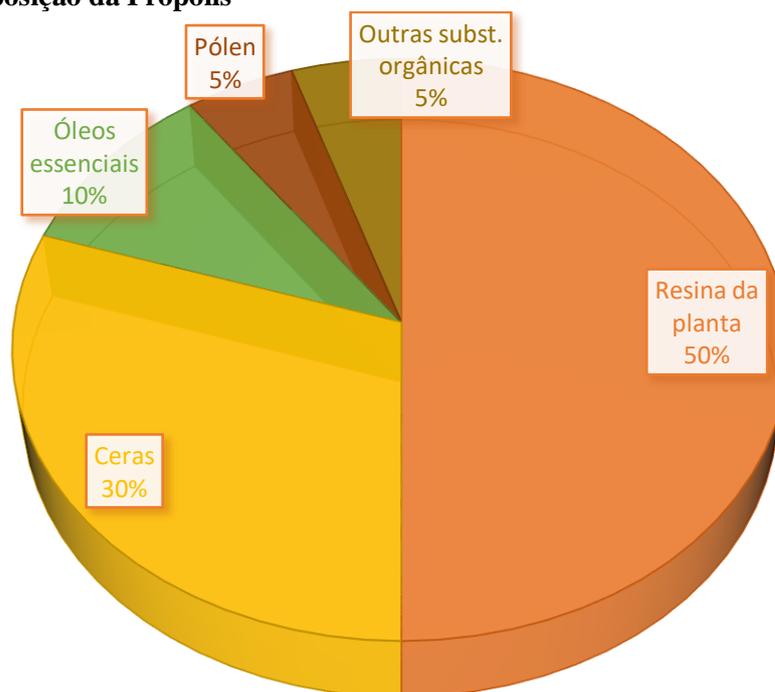
2.7 Composição química da própolis

Sabe-se que a composição química da própolis apresenta mudanças de um tipo para o outro, ou do mesmo tipo, sendo coletadas em épocas do ano diferentes. No primeiro caso, ocorre devido à variabilidade da vegetação na qual as abelhas coletam o material (metabólitos secundários) para sua produção e, no segundo caso, devido à sazonalidade na região em que a vegetação se desenvolve no decorrer do ano. Essa dependência do clima e da vegetação local promove uma diversidade acentuada dos metabólitos secundários disponíveis, principalmente em regiões tropicais e com uma grande biodiversidade, como é o caso do Brasil (LÓPEZ, SCHMIDT et al., 2014; PICCINELLI, LOTTI et al., 2011; CABRAL, OLDONI et al., 2009).

Na composição geral da própolis, encontra-se, aproximadamente, 50% de resinas, 30% de ceras e o restante de óleos essenciais, pólen e outros compostos orgânicos (Figura 14). Vários componentes podem ser encontrados em todos os tipos de própolis, tais como:

- Hidrocarbonetos superiores;
- Álcoois;
- Ácidos alifáticos e seus ésteres derivados;
- Ácidos aromáticos e seus ésteres aromáticos derivados;
- Ácidos graxos superiores típicos de ceras e seus ésteres;
- Aldeídos;
- Cetonas;
- Flavonas e flavonóis;
- Flavanonas;
- Chalconas e diidrochalconas;
- Terpenóides e sesquiterpenóides;
- Esteroides;
- Aminoácidos;
- Açúcares;
- Lignanas;
- Vitaminas e minerais.

Porém, existe uma parcela de substâncias que depende da vegetação de origem, sazonalidade e parte da planta que o material foi coletado (DE VARGAS, LOGUERCIO et al., 2004; TOMAZZOLI, ZEGGIO et al., 2020; DO NASCIMENTO, ARRUDA et al., 2019; PAGANOTTI, 2013).

Figura 14. Composição da Própolis

Fonte: Przybyłek e Karpiński (2019).

Segundo Paganotti (2013), amostras das própolis encontradas na Europa e na China, apresentam tipos variados de flavonoides e ácidos fenólicos, enquanto que as coletadas em terrenos brasileiros tiveram maiores quantidades de terpenóides e derivados prenilados de ácido *p*-cumárico. O mesmo também relata, que em zonas temperadas as substâncias majoritárias com propriedades biológicas presentes na própolis são os polifenóis: flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres. Nessa região a própolis possui maior teor de flavonoides do que a própolis de zonas tropicais, que por sua vez apresentam maiores quantidades de outros compostos fenólicos, como os fenilpropanóides prenilados, encontrados na própolis do Brasil e as benzofenonas poli-isopreniladas, encontradas nas amostras de Cuba.

Estudos vêm sendo desenvolvidos há pelo menos 20 anos para se obter maior conhecimento da composição química da própolis produzida no Brasil. Aproximadamente 300 componentes já foram identificados até agora, em amostras de diferentes tipos de própolis, dentre os quais estão os ácidos graxos, ácidos fenólicos, ésteres fenólicos, terpenos, β -esteróis, aldeídos aromáticos, álcoois, sesquiterpenos e naftalenos (MARTINI, BARBOSA et al., 2017).

Park et al. (2002) analisaram extratos etanólicos de três tipos de própolis encontradas no Brasil, que se diferenciam quanto a coloração da própolis, região que é encontrada e quanto a origem botânica. A região em que cada própolis foi coletada foi Sul, Sudeste e Nordeste, sendo elas marrom, verde e vermelha, respectivamente. A origem botânica foi detectada para

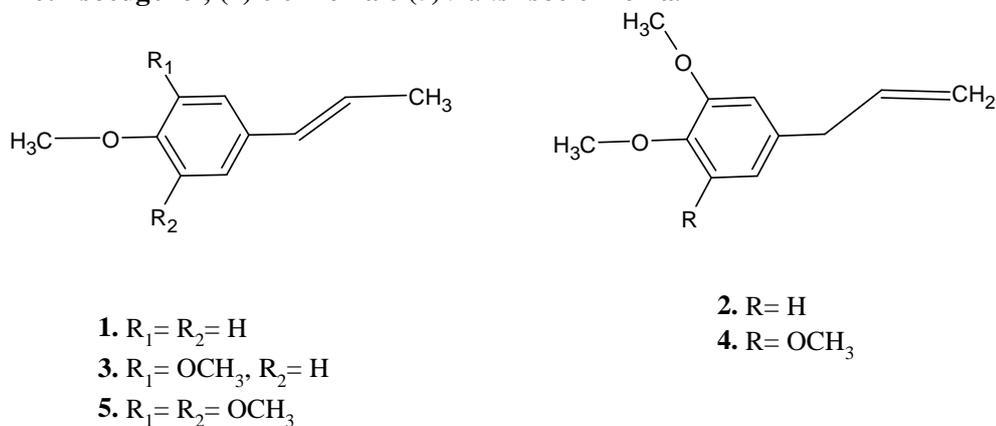
cada uma dessas própolis através de análises realizadas por espectroscopia UV e cromatografias RP-HPTLC, RP-HPLC e GC-MS.

Com os resultados desse e de outros estudos constatou-se que a própolis brasileira apresenta os compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico (ácido diidrocinâmico, ácido artepilina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido caféico), inclusive derivados mono e diprenilados do ácido *p*-cumárico, são os seus constituintes principais, ao lado de benzopiranos, flavanonas preniladas, benzofenona, triterpenóides (cicloartano, alcanatos de lupeol, ácido morônico e 3β -acetato de bauerenol) e epóxidos de naftoquinonas (MARCUCCI, RODRIGUEZ et al., 1998; TAZAWA, WARASHINA et al., 1998; TAZAWA, TSUTOMU e NORO, 1999; BANKOVA, DE CASTRO e MARCUCCI, 2000; PARK, PAREDES-GUZMAN et al., 2004; PAGANOTTI, 2013; DE LIMA, 2018).

2.7.1 Composição química da própolis vermelha

A própolis vermelha encontrada no estado de Alagoas é caracterizada quimicamente pela presença de terpenos, flavonoides, isoflavonoides, ácidos aromáticos e ácidos graxos (RUFATTO, DOS SANTOS et al., 2017). Trusheva et al. (2006) mostraram que o extrato etanólico da própolis vermelha de Alagoas, da cidade de Maceió, é composto por derivados de fenilpropenos (Figura 15), sendo a elimicina encontrada em maior quantidade. Destes compostos, o metileugenol, metiliseugenol, elemicina e a isoelemicina foram encontrados em amostras de própolis pela primeira vez.

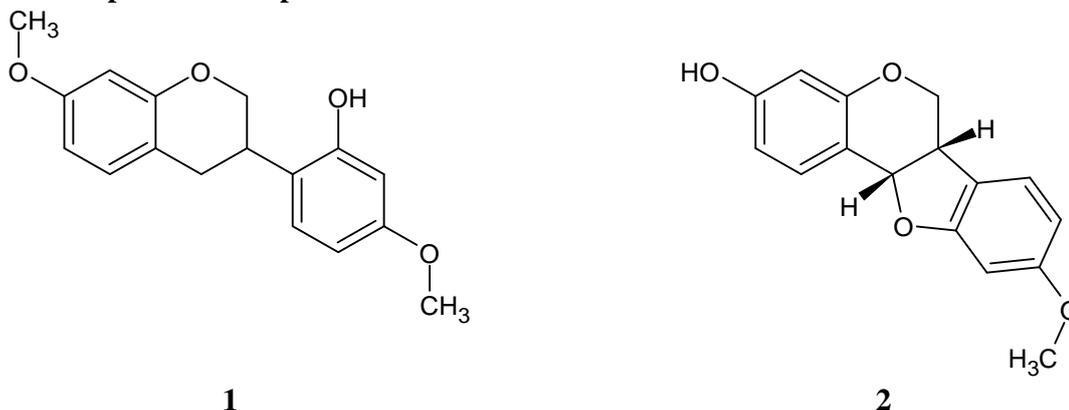
Figura 15. Estrutura molecular dos derivados de fenilpropeno. (1) *trans*-anetol, (2) metileugenol, (3) *trans*-metiliseugenol, (4) elemicina e (5) *trans*-isoelemicina.



Fonte: Trusheva, Popova et al. (2006).

Além destes compostos, também foram encontrados álcoois triterpênicos, tipicamente presentes em própolis brasileira e dois isoflavonoides, a isoflavana isosativam e o pterocarpano medicarpina (Figura 16) (TRUSHEVA, POPOVA et al., 2006).

Figura 16. Isoflavonoides encontrados na própolis vermelha de Alagoas. (1) Isoflavana isosativam e (2) Pterocarpano medicarpina.



Fonte: Trusheva, Popova et al. (2006).

Outro estudo, também realizado com a própolis vermelha de Alagoas, comparou a sua composição química com a composição química da *D. ecastaphyllum*, possível origem botânica, na qual foram identificados dois flavonoides, o flavonol quercetina e a flavona crisina e também um ácido fenólico, o ácido ferúlico, que estão presentes nos outros 12 tipos de própolis estudadas por Park et al. (2004). Porém, observou-se também a presença dois isoflavonoides pterocarpanos, a medicarpina e o 3-hidroxi-8,9-dimetoxipterocarpano, sendo possível correlacionar que a sua origem botânica ocorre a partir do rabo-de-bugio, *D. ecastaphyllum* (SILVA, ROSALEN et al., 2008).

Trabalhos que também buscaram investigar a composição da própolis vermelha mostraram a presença das flavonas, luteolina e crisina, dos flavonóis, a rutina e a quercetina, dos di-idroflavanois, a liquiritigenina, pinobaksina, pinocembrina e a naringenina, da chalcona, a isoliquiritigenina, dos isoflavonoides, as isoflavonas, formononetina, biochanina A e daidzeína e a isoflavana, vestitol ou isovestitol. Além disso, também foram encontradas a xantona, gutiferona E ou xantoquimol, os taninos condensados, a catequina e a epicatequina, os ácidos fenólicos derivados dos ácidos benzóicos, o ácido gálico e dos derivados dos ácidos cinâmicos, o ácido caféico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico (DOS SANTOS, MUNARI et al., 2019; RUFATTO, LUCHTENBERG et al., 2018; ALMEIDA, DA SILVA et al., 2017; ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

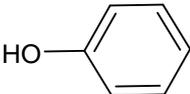
2.7.2 Compostos fenólicos

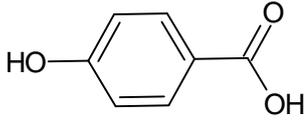
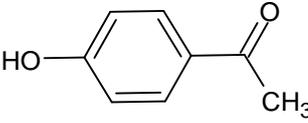
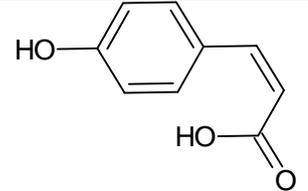
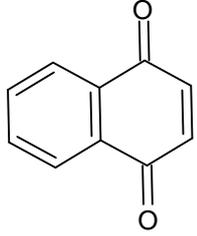
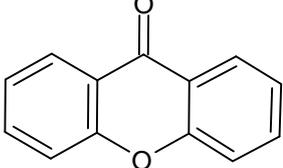
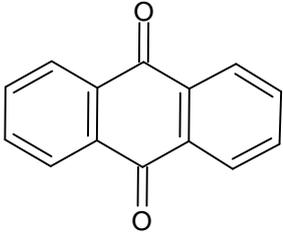
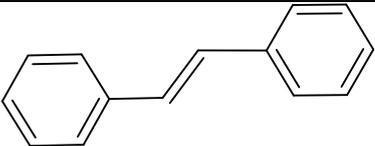
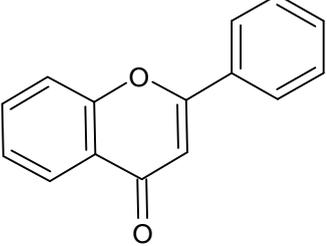
Os compostos fenólicos são todas as substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos, onde ocorreu a substituição de pelo menos um hidrogênio pelo grupamento hidroxila. Estes apresentam ou não diferentes graus de polimerização. Mais de 8000 estruturas fenólicas presentes no reino vegetal já foram descritas. Existem alguns compostos fenólicos que ocorrem de forma livre, que são chamados de agliconas, como também existem aqueles que se apresentam ligados à açúcares, que são conhecidos como glicosídeos ou heterosídeos, bem como, existem os terpenos e alcaloides que estão ligados às proteínas. Exemplos de compostos fenólicos são os ácidos fenólicos, quinonas, fenilpropanoides, cumarinas, flavonoides, substâncias poliméricas (taninos, ligninas) (DE REZENDE, ROSADO et al., 2016; CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2003; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

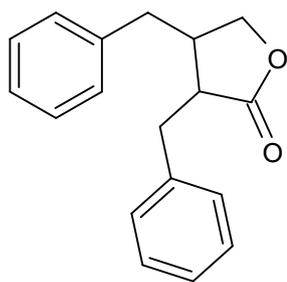
Estes compostos são metabólitos secundários, importantes para o crescimento, desenvolvimento e perpetuação das espécies. Sendo assim, são utilizados como defesa contra microrganismos, radiação UV, então, são encontrados em maiores concentrações nas plantas em momentos de estresse. São responsáveis por conferir sabor, odor e coloração aos organismos em que são encontrados (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2003). Existem muitos compostos fenólicos bastante conhecidos pela sua aplicação em alimentos devido a suas características organolépticas, como exemplo a vanilina, que dá aos alimentos o sabor/aroma baunilha, o aldeído cinâmico que confere o sabor característico da canela, o *t*-anetol, aroma do aniz e o eugenol, presente no óleo de cravo (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2003; ANGELO e JORGE, 2007).

A classificação dos compostos fenólicos ocorre segundo a sua estrutura molecular principal pelo número e disposição dos átomos de carbono, conforme a Tabela 2 (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

Tabela 2. Classificação dos compostos fenólicos.

Estrutura molecular principal	Esqueleto básico	Classe dos compostos fenólicos
	C ₆	Fenóis simples, benzoquinonas

	$C_6 - C_1$	Ácidos fenólicos
	$C_6 - C_2$	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
	$C_6 - C_3$	Fenilpropanoides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas.
	$C_6 - C_4$	Naftoquinonas
	$C_6 - C_1 - C_6$	Xantonas
	$C_6 - C_2 - C_6$	Antraquinonas
	$C_6 - C_2 - C_6$	Estilbenos
	$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides e Isoflavonoides


 $(C_6 - C_3)_2$

Lignanas

Fonte: Adaptada de Carvalho, Gosmann e Schenkel (2003).

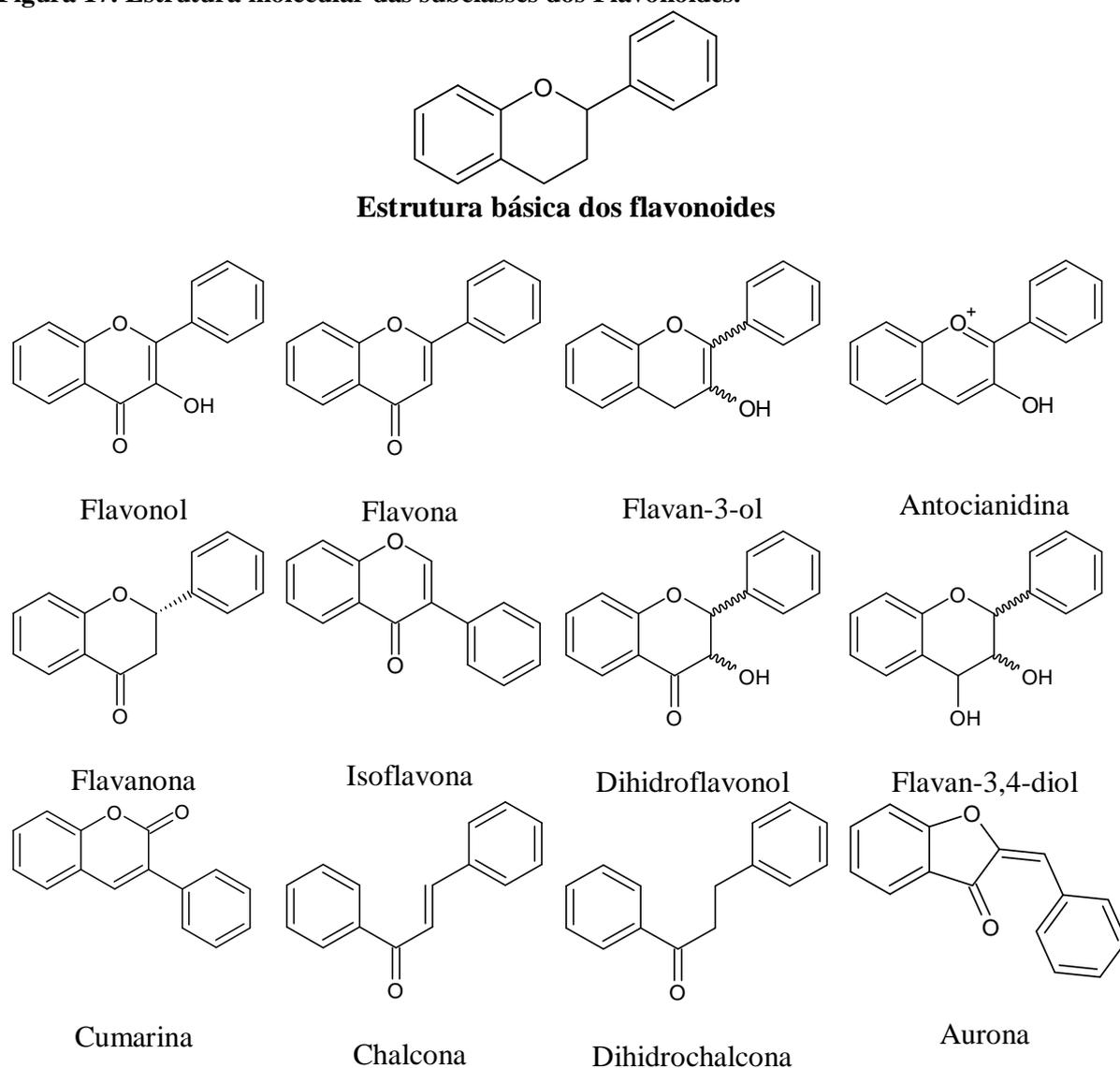
2.7.2.1 Flavonoides

Os flavonoides são os metabólitos secundários mais abundantes nos vegetais, encontrados principalmente na epiderme das folhas e nas cascas dos frutos, ocorrendo em diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontram. Apresentam diversas funções para as plantas, desde proteção contra radiação UV, ataque de insetos, vírus, fungos e bactérias, como também, ação antioxidante, controle hormonal dos vegetais, ação alelopática e inibidores de enzimas. Têm importância econômica devido à pigmentação e valor nutricional que conferem aos alimentos, além das propriedades farmacológicas como antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, que são atribuídos a alguns representantes dessa classe (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

São compostos sintetizados através da rota biossintética mista. Pertencem a classe dos polifenóis ou fenóis, apresentando, então, em sua estrutura molecular, um ou mais núcleos aromáticos com substituintes de grupos hidroxílicos e/ou seus derivados, que podem ser ésteres, éteres, glicosídeos entre outros (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

O esqueleto molecular básico dos flavonoides pode ser substituído de várias formas dando origem as subclasses flavonóis, flavonas, flavan-3-nois, antocianidinas, flavanonas, isoflavonas, que estão presentes em maior quantidade nos vegetais quando comparadas com as subclasses de dihidrofavonois, flavan-3,4-diois, cumarinas, chalconas, dihydrochalconas e auronas. Mesmo tendo uma grande variedade de representantes dessa classe, a maioria das estruturas apresentam 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental (Figura 17) (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009; ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

Figura 17. Estrutura molecular das subclasses dos Flavonoides.



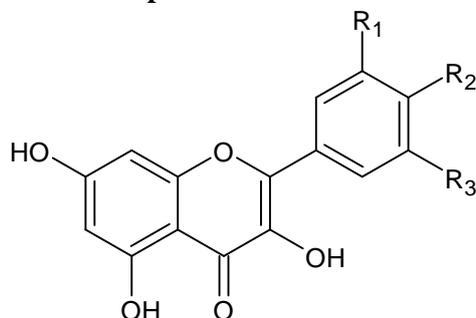
Fone: Crozier, Jaganath e Clifford (2009).

Frequentemente, os flavonoides de origem natural encontram-se oxigenados e uma grande parte apresenta-se conjugada com açúcares, que são denominados heterosídeos (*O*-heterosídeo, quando a ligação ocorre por intermédio de uma hidroxila e *C*-heterosídeo, quando a ligação ocorre por intermédio de um átomo de carbono). Os flavonoides que não se apresentam conjugados com açúcares, ou seja, encontram-se na forma livre, são denominados de agliconas (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

As substâncias da subclasse flavonol são as mais amplamente distribuídas no reino vegetal só estando ausentes nas algas. Eles podem ser considerados flavonas substituídas na posição C-3 por uma hidroxila. Suas variações estruturais são bastante documentadas e como exemplo tem-se o canferol, a quercetina, a isorramnetina, a miricetina (Figura 18), que são

comumente encontrados na forma de *O*-heterosídeos (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

Figura 18. Estrutura molecular de representantes mais comuns dos flavonóis.

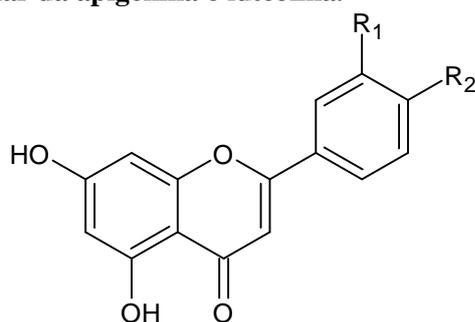


Canferol	$R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H$
Quercetina	$R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = H$
Isorramnetina	$R_1 = OCH_3, R_2 = OH, R_3 = H$
Miricetina	$R_1 = OH, R_2 = OH, R_3 = OH$

Fonte: Crozier, Jaganath e Clifford (2009).

As flavonas apresentam uma rota biossintética muito próxima da rota dos flavonóis, em que estes são derivados da 3-hidróxi-2-fenilcromona e as flavonas derivadas da 2-fenilcromona. São substâncias de coloração que variam do branco ao amarelo intenso. Assim como os flavonóis, a maioria das flavonas são encontradas na sua forma conjugada com um ou mais açúcares formando *O*-heterosídeos. A apigenina e luteolina (Figura 19), na forma livre ou conjugada, são as flavonas mais comumente encontradas nas plantas. Esta subclasse apresenta baixa distribuição (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

Figura 19. Estrutura molecular da apigenina e luteolina.

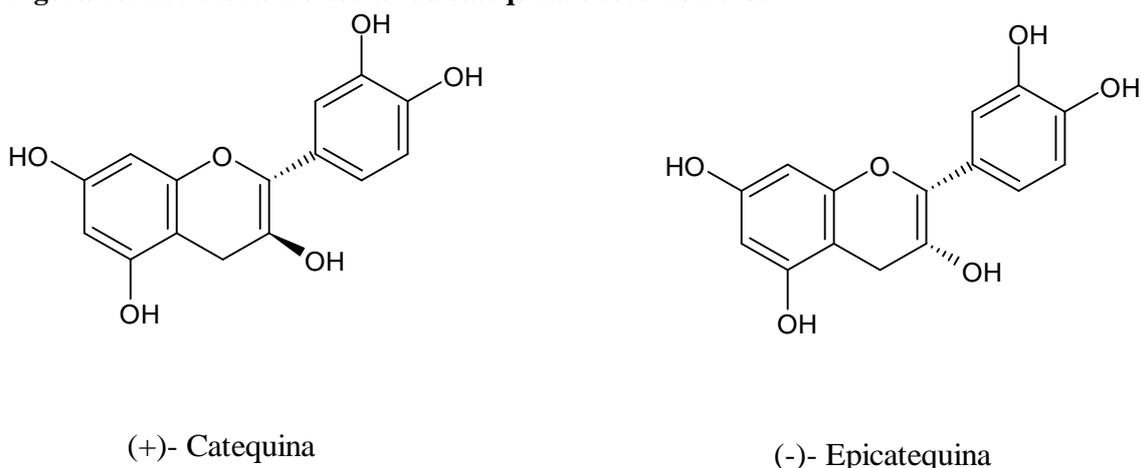


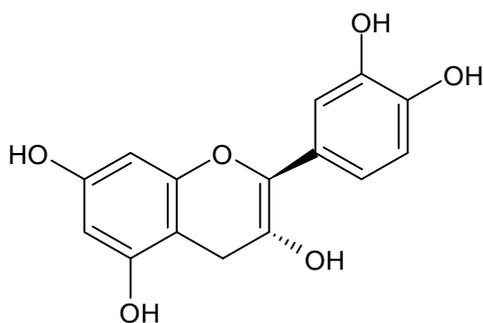
Apigenina	$R_1 = H, R_2 = OH$
Luteolina	$R_1 = OH, R_2 = OH$

Fonte: Crozier, Jaganath e Clifford (2009).

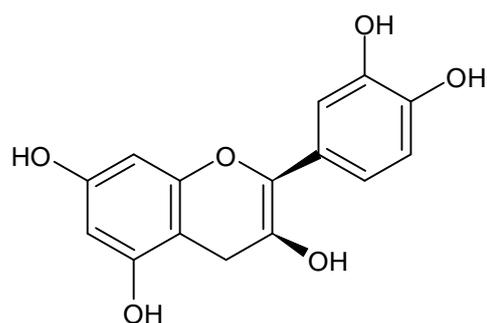
A subclasse dos flavan-3-óis apresentam substâncias estruturalmente complexas devido aos dois centros quirais que apresentam, o C2 e o C3, formando quatro isômeros (+)- catequina e (-)- epicatequina bastante difundido e a (-)- catequina e (+)- epicatequina, mais difíceis de serem encontrados (Figura 20). Provavelmente a catequina é sintetizada a partir das leucocianidinas que, posteriormente, sofrem redução no C4, formando as proantocianididas oligoméricas ou poliméricas, conhecidas como taninos condensados (SANTOS e DE MELLO, 2003; CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

Figura 20. Estrutura molecular da catequina e seus isômeros.





(-)- Catequina

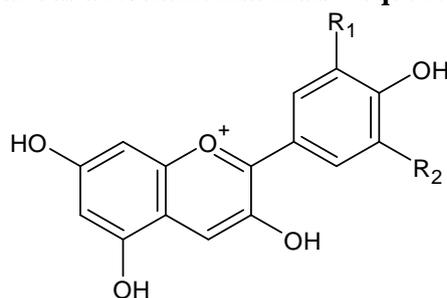


(+) - Epicatequina

Fonte: Crozier, Jaganath e Clifford (2009).

As antocianidinas estão amplamente distribuídas no reino vegetal e são, em sua maioria, responsáveis pela coloração vermelha, rosa, laranja, azul, violeta, roxa, das flores e frutos, que atraem animais com o objetivo de polinizar e dispersar as sementes. São também encontrados em outros órgãos das plantas. Pela coloração que possuem são considerados aditivos eficazes para uso em alimentos, porém, devido a sua baixa instabilidade não são muito utilizados. São também interessantes para a área farmacêutica por apresentarem atividade anti-inflamatória. As antocianidinas mais comuns são a pelargonidina, cianidina, malvidina, delphinidina, peonidina e etunidina (Figura 21). São mais facilmente encontradas na forma de heterosídeos, conhecidos como antocianinas (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

Figura 21. Estrutura molecular das antocianidinas mais frequentemente encontradas na natureza.



Pelargonidina	R ₁ = H, R ₂ = H
Cianidina	R ₁ = H, R ₂ = OH
Malvidina	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = OCH ₃
Delfinidina	R ₁ = OH, R ₂ = OH
Peonidina	R ₁ = OH, R ₂ = OCH ₃
Etunidina	R ₁ = OH, R ₂ = OCH ₃

Fonte: Adaptada de Zuanazzi e Montanha (2003).

As flavanonas são encontradas, preferencialmente, nas cascas dos frutos cítricos. São compostos intermediários na biossíntese da maioria das classes dos flavonoides. Os representantes mais comuns dessa subclasse são a liquiritigenina, hesperidina, hesperetina, naringenina, narigina, pinocembrina (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

Os isoflavonoides apresentam distribuição taxonômica limitada, encontrados quase que exclusivamente na família das plantas leguminosas, Leguminosae, diferentes dos outros tipos de flavonoides. Sua biossíntese ocorre via chalconas (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003). Ocasionalmente podem ser encontradas também na subfamília Caesalpinioideae e em outras famílias como a Rosaceae, Moraceae, Amaranthaceae, Iridaceae e Podocarpaceae. Nessa classe encontram-se as isoflavonas, isoflavononas, isoflavanos, aril-3-cumarinas, rotenóides, pterocarpanos e cumestanos. As isoflavonas, geralmente, servem de intermediários para a síntese das isoflavononas, isoflavanos e pterocarpanos (WONG, 1975).

As isoflavonas são as substâncias, do grupo dos isoflavonoides, mais comumente encontradas na natureza, seguido pelos pterocarpanos (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003). Seus componentes mais comuns são a daidzeína, genisteína, formononetina, precursora da daidzeína e biochanina A, precursora da genisteína (DUNCAN, PHIPPS e KURZER, 2003). Essas substâncias possuem atividade estrogênica, sendo denominados de fitoestrogênios, possivelmente esses componentes conseguem imitar o hormônio esteroide estradiol, que bloqueia a ovulação, pois apresentam estrutura química análoga ao mesmo (CROZIER, JAGANATH e CLIFFORD, 2009).

Segundo Corzier e colaboradores (2009), esses compostos são capazes de reduzir a ocorrência de câncer de próstata e de mama. O crescimento do câncer de próstata é induzido pela testosterona androgênica, que por sua vez tem a produção reduzida na presença do estradiol. No entanto, o estradiol natural ocorre em quantidades insuficientes no organismo do homem e, então, as isoflavonas podem ser uma estratégia para diminuir os níveis de testosterona androgênica e, conseqüentemente, inibir o desenvolvimento das células cancerígenas.

Quando mencionado o câncer de mama, os mesmos autores reportam que este depende da suplementação de estrógenos para se desenvolver, principalmente, na fase inicial, dessa forma as isoflavonas competem com esses hormônios ligando-se ao sítio ativo do mesmo impedindo-o de se ligar, conseqüentemente, restringe a sua ação extinguindo o crescimento das células cancerígenas. Essas substâncias podem agir de três diferentes formas, como o hormônio estrógeno, como anti-estrógeno e como antioxidantes.

Na literatura há relatos de que das isoflavonas existentes a única que é capaz de agir na inibição das células cancerígenas em concentrações fisiológicas é a genisteína e que a daidzeína

só é capaz de agir se estiver na presença desta (QUEIROZ, NOGUEIRA e SCRAMIN, 2006). As isoflavonas podem ser diferenciadas das flavonas e isoflavononas através da espectroscopia UV, pois as isoflavonas simples apresentam absorção intensa entre 255 – 275 nm e geralmente uma banda na região de 310 – 330 nm (WONG, 1975).

As isoflavanas são as substâncias, do grupo dos isoflavonoides, encontradas em menor quantidade, um de seus representantes, o equol, pode ser encontrado na urina de mamíferos como produto de degradação da daidzeína adquirida através da alimentação por bactérias intestinais (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003; KARSLI-CEPPIOGLU, NGOLLO et al., 2015).

2.7.2.2 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos (fenóis simples e ácidos fenolcarboxílicos) podem ser derivados de ácidos benzóicos e de ácidos cinâmicos, originando duas classes os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos, respectivamente. Podem ser citados o ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido salicílico, ácido vanílico são representantes da primeira classe e são encontrados amplamente distribuídos em angiospermas e gimnospermas. Já os ácidos ferúlico, *p*-cumárico, caféico e sinápico são representantes da segunda classe, que são mais facilmente encontrados em planta e grãos (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2003).

Os ácidos fenólicos são encontrados, em sua maioria, nos tecidos vegetais na forma conjugada com ésteres e amidas, porém, apesar de raro também podem ser encontrados conjugados com glicosídeos, exemplo, o éster ácido clorogênico, encontrado no grão de café (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2003; KARAKAYA, 2004).

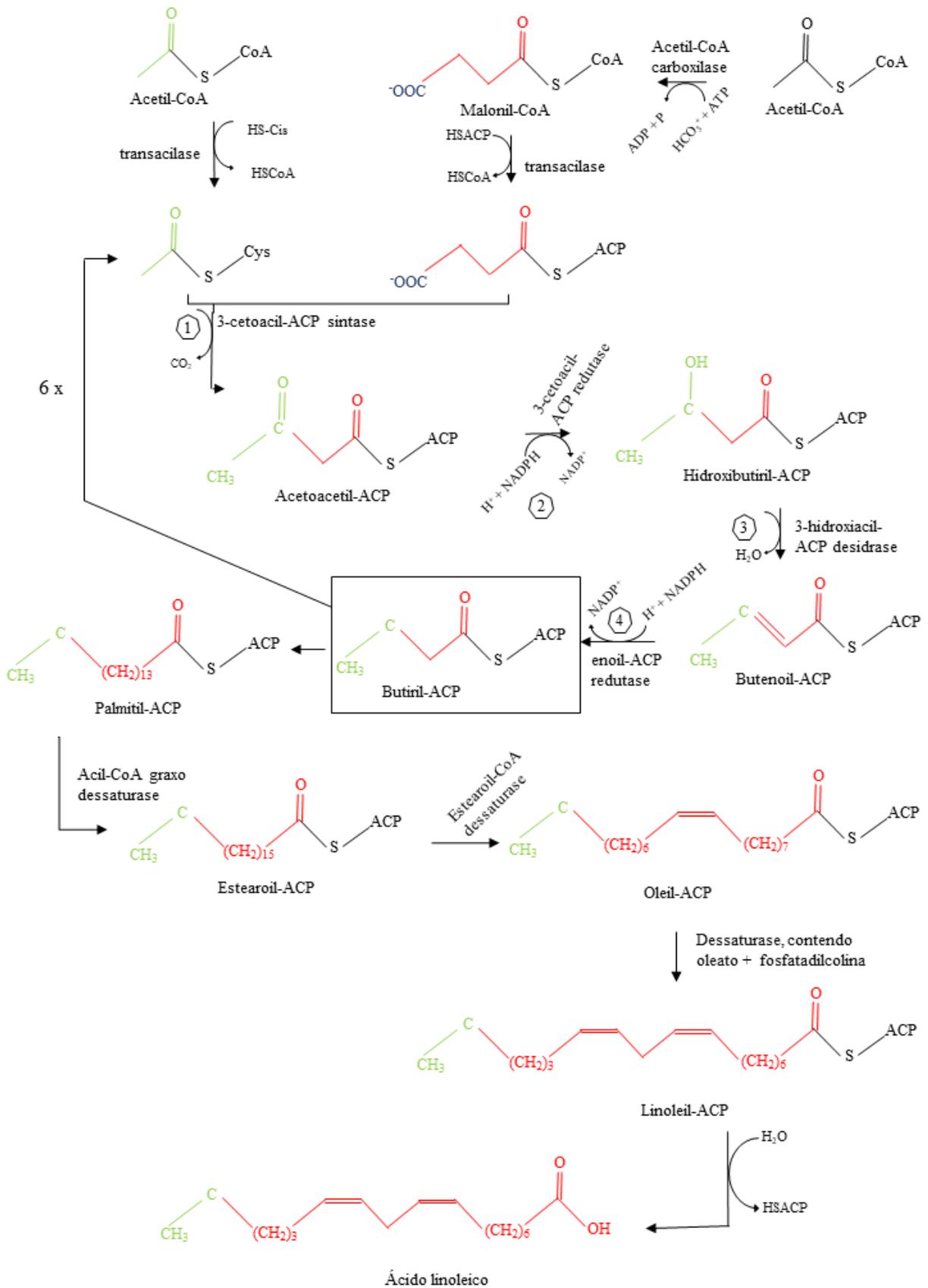
2.7.2.3 Derivados dos ácidos graxos

Ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos lineares ramificados ou não. Existem quatro ácidos graxos o ácido palmítico (C₁₆), o ácido esteárico (C₁₈), o ácido oleico (C₁₈) e o ácido linoleico (C₁₈) que dão origem aos 95% dos ácidos dos diversos tipos de lipídeos (DE REZENDE, ROSADO et al., 2016).

Esses ácidos são compostos derivados da via do acetato malonato onde, inicialmente ocorre a carboxilação da acetil-CoA, mediada pelo complexo multienzimático acetil-CoA carboxilase, que contém biotina como grupamento prostético, formando malonil-CoA. Posteriormente ocorre a condensação de unidades de malonil-CoA e de acetil-CoA

intermediada pela ação do complexo enzimático FAS (ácido graxo sintetase, do inglês, *fatty acid synthase*), seguindo por uma sequência de reação de redução, desidratação e redução, que dá origem ao bunitil ligada à proteína carreadora de acilas (ACP, do inglês, *acyl carrier protein*). Este retorna ao ponto inicial onde seu grupamento acila condensa com uma nova molécula de malonil-CoA passando novamente pelas etapas de 1 a 4 da rota biossintética (Figura 22). Este processo se repete seis vezes, consumindo 7 malonil-CoA, formando o precursor do ácido graxo com 16 carbonos (C₁₆), ácido palmítico, a partir deste dá origem ao precursor do ácido esteárico (C_{18:0}), deste surge o precursor do ácido oleico (C_{18:1}) que, por sua vez, dá origem ao precursor do ácido linoleico (C_{18:2}). O alongamento das cadeias de ácidos graxos se dá pela ação de enzimas conhecidas como alongases e as enzimas dessaturases introduzem ligações duplas nos ácidos graxos saturados. Exemplo, ocorre dessaturação na molécula de linoleato dando origem ao linolenato que sofre alongamento para C₂₀ seguido se uma dessaturação resultando na formação do ácido araquidônico (MOYNA e HEINZEN, 2003; DE REZENDE, ROSADO et al., 2016; DOS SANTOS, 2003; PRATT e CORNEY, 2006).

Figura 22. Rota biossintética do acetato malonato.



Fonte: Adaptada de Pratt e Corney (2006).

Os ácidos graxos formados podem sofrer descarboxilação formando os alcanos, álcoois secundários e cetonas ou redução formando álcoois primários e ésteres. Há, dentro do grupo dos ácidos graxos, as acetogeninas (C₃₄ e C₃₇), que são compostos derivados dos ácidos graxos C₃₂ e C₃₄, onde ocorre uma reação de adição de uma molécula de propano-2-ol, formando um anel lactônico, que caracteriza as acetogeninas (MOYNA e HEINZEN, 2003; DE REZENDE, ROSADO et al., 2016; DOS SANTOS, 2003).

Os ácidos graxos são utilizados em suplementação alimentar que tenha o intuito de prevenir enfermidades cardiovasculares. Nas plantas esses componentes lipídicos são constituintes da cera cuticular, que é formada de uma mistura complexa de hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa de série homóloga. As ceras têm característica hidrofóbica, que mantem a superfície dos tecidos das plantas impermeável e evita a perda de água desses durante a transpiração. Além disso, o revestimento das partes aéreas das plantas as protegem contra a radiação UV e contra entrada de patógenos e poluentes. A acetogenina, por sua vez, é produzida para suprimir a alimentação de insetos invasores e apresentam propriedades antitumoral, antimicrobiana, anti-helmíntica e antiprotozoário (DE REZENDE, ROSADO et al., 2016; MOYNA e HEINZEN, 2003).

2.8 Atividades biológicas da própolis

Devido à sua composição química bastante diversificada e complexa, a própolis possui ampla atividade biológica. Essa composição sofre variações quanto à origem botânica como da sazonalidade. Na variação da composição, quando ocorre a diminuição de um componente biologicamente ativo, ocorre o aparecimento de outro componente, também biologicamente ativo, como fator de compensação; por exemplo, quando os ácidos fenólicos são reduzidos aparecem em maior quantidade de ácidos diterpênicos (BANKOVA, DE CASTRO e MARCUCCI, 2000; NUNES, GALINDO et al., 2009).

Apesar da própolis apresentar essa diferença na composição devido à diversidade da vegetação e estação do ano, possui atividades semelhantes (PRZYBYŁEK e KARPIŃSKI, 2019). Dentre as atividades biológicas conhecidas da própolis encontram-se sua ação antimicrobiana, antioxidante (FREIRES, QUEIROZ et al., 2016; VEIGA, DE MENDONÇA et al., 2017; ANDRADE, DENADAI et al., 2017; DO NASCIMENTO, ARRUDA et al., 2019), anti-inflamatória (BUENO-SILVA, ROSALEN et al., 2017; BATISTA, ALVES et al., 2018), anticancerígena (NANI, FRANCHIN et al., 2018) e antiparasitária (DO NASCIMENTO, SILVA et al., 2016; SILVA, MACHADO et al., 2017).

2.8.1 Atividade antimicrobiana

Os medicamentos mais utilizados contra infecções bacterianas com *Staphylococcus aureus* são os β -lactâmicos (metecilina) associados a inibidores da β -lactamase, enzimas que algumas bactérias desenvolveram ao longo dos anos, criando resistência aos medicamentos β -lactâmicos inicialmente utilizados (VEIGA, DE MENDONÇA et al., 2017).

A Organização Mundial de Saúde, entre os anos de 2016 e 2017, divulgou uma lista das bactérias com grande potencial de causar sérios danos à saúde humana que apresentam resistências aos antibióticos que existem disponíveis no mercado com o objetivo de alertar para a necessidade de desenvolvimento de novos medicamentos para o combate desses patógenos. Foram relatadas, nessa lista, bactérias que são resistentes aos carbapenêmicos (β -lactâmico), medicamento de último recurso, utilizado apenas quando os outros antibióticos falham. No ano desse estudo esses patógenos tinham uma taxa de mortalidade mundial de 700.000 pessoas por ano e os cientistas alertaram que podem atingir cerca de 10 milhões por ano em 2050, caso não sejam desenvolvidos novos medicamentos. Estudos vêm sendo realizados com o intuito de não deixar isso se tornar realidade, em 2016, só nos EUA cerca de 40 novos antibióticos estavam sendo avaliados (WILLYARD, 2017).

Também vem sendo desenvolvidos estudos com a utilização da nanotecnologia no combate a essas bactérias. Um estudo de revisão da literatura mostrou que os nanoprodutos desenvolvidos, tal como nanopartículas de prata (AgNPs) que apresentam atividade antimicrobiana, vêm sendo direcionados ao combate de bactérias multirresistentes. Também podem ser desenvolvidos nanomateriais para o carreamento das drogas existentes, facilitando a entrada destes no meio intracelular, podendo ainda agir como uma proteção contra o mecanismo de resistência bacteriana (BAPTISTA, MCCUSKER et al., 2018).

Dessa forma a propriedade antimicrobiana de produtos naturais como a própolis vem sendo estudada (LUSTOSA, GALINDO et al., 2008; CABRAL, OLDONI et al., 2009). Para a atividade antimicrobiana, sabe-se que é importante a presença de flavonoides e dos compostos fenólicos como todo (PRZYBYŁEK e KARPIŃSKI, 2019).

Veiga e colaboradores (2017) avaliaram o poder antimicrobiano e antioxidante da Artepilin C, um composto fenólico, mais especificamente um ácido *p*-cumárico, presente em altas concentrações na própolis verde da região sudeste do Brasil, que tem como origem botânica o alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*L). O estudo foi realizado para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*) para inibir o crescimento de 90% (MIC₉₀) de bactérias da espécie *S. aureus* com

extratos hexânicos e etanólicos tanto da própolis verde como do material coletado na *B. dracunculifolia*. Os extratos etanólicos da própolis apresentou maiores concentrações da Artepilin C e foi necessária uma menor concentração desse extrato para atingir a MIC₉₀, o mesmo não foi observado para o extrato etanólico do alecrim do campo, sendo preciso uma maior concentração para atingir o MIC₉₀, isso ocorreu devido à composição química da própolis ser mais rica em compostos bioativos que o extrato do material coletado diretamente do alecrim do campo.

Bispo Júnior e colaboradores (2012) analisou a atividade antimicrobiana e antifúngica de extrato etanólico e das frações hexânicas e acetonólicas da própolis vermelha de Alagoas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e contra cepas do fungo *Candida albicans*. As linhagens bacterianas utilizadas foram: *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus* e *Escherichia coli*. Em todas as espécies testadas os extratos mostraram eficiência de 76,9%, tendo eficiência contra as bactérias Gram-positivas de 100% e contra as Gram-negativas de 62,5%. A cepa de *K. pneumoniae* foi resistente a esses extratos. A atividade antifúngica para a cepa de *C. albicans* foi observado uma MIC similar ao valor que foi encontrado contra as bactérias Gram-positivas.

Possivelmente a baixa efetividade dos extratos de própolis frente às bactérias Gram negativas se deve ao fato destas bactérias apresentarem uma parede celular quimicamente mais complexa e com conteúdo lipídico elevado e pela produção de enzimas hidrolíticas que degradam os produtos bioativos da própolis, o que as tornam mais resistentes (DE VARGAS, LOGUERCIO et al., 2004; PRZYBYŁEK e KARPIŃSKI, 2019).

Nesse ano de 2020 foi publicado um estudo com a própolis vermelha carregada em um sistema nanoparticulado com poli(ácido-láctico-co-glicólico) (PLGA) avaliando a sua atividade contra biofilmes bacterianos, um sistema de defesa criado pelas bactérias resistentes, é um tipo de matriz polimérica extracelular que envolve um grupo de microrganismo. Essas NPs com a própolis vermelha foram testadas quanto à capacidade de romper os biofilmes produzidos por bactérias Gram-positivas, *S. aureus* sensíveis e resistentes à metilina e a Gram-negativas, *P. aeruginosa*. O extrato da própolis vermelha apresentou melhor resultado de MIC₅₀ para as bactérias *S. aureus* que para as *P. aeruginosa*, sendo, para essas, necessário uma concentração 4 vezes maior para atingir a MIC₅₀. O mesmo comportamento foi observado para o extrato carregados nas NPs de PLGA, porém para estas as MICs foram mais altas, esse comportamento pode estar associado à característica de liberação controlada do sistema nanoparticulado (DE MÉLO SILVA, GASPAR et al., 2020).

O mecanismo de ação antimicrobiana da própolis pode ser atribuído ao um sinergismo entre a sua composição química complexa, os compostos fenólicos, especialmente flavonoides, ácidos fenólicos e os seus ésteres (VEIGA, DE MENDONÇA et al., 2017). Essa complexidade possivelmente dificulta a criação da resistência bacteriana contra esses produtos naturais (PRZYBYŁEK e KARPIŃSKI, 2019; DE MÉLO SILVA, GASPAR et al., 2020).

Segundo Lustosa et al. (2008), estas ações são atribuídas à presença de flavonona, pinocembrina, ao flavonol, galagina e ao éster feniletílico do ácido caféico, que agem inibindo o RNA-polimerase bacteriano. Outros componentes agem provavelmente na membrana celular dos microrganismos causando danos estruturais ou funcionais.

Os pterocarpanos constituem o segundo maior grupo de isoflavonoides naturais e têm despertado interesse devido aos vastos efeitos biológicos. Muitos deles são fitoalexinas que possuem elevada atividade antifúngica e antibacteriana. As ações antimicrobianas e antifúngicas também podem ser atribuídas às chalconas que representam um grupo importante de compostos naturais (RIGHI, ALVES et al., 2011).

Com base na revisão bibliográfica feita por Przybyłek e Karpiński (2019) a ação antimicrobiana da própolis pode ser direta, agindo no microrganismo, ou indireta, agindo no sistema imunológico induzindo o próprio organismo a reagir contra o patógeno. Quanto a sua ação direta, possivelmente a própolis age na permeabilidade da membrana celular interrompendo o potencial de membrana e na produção de adenosina trifosfato (ATP) e também pode reduzir a mobilidade celular.

2.8.2 Atividade antiviral

Assim como a resistência bacteriana, os surtos e resistências virais também são uma preocupação frequente para os humanos. Desde o ano passado, o mundo vem enfrentando o mais recente caso pandêmico com a síndrome respiratória aguda grave causado pelo vírus coronavírus 2 (SARS-CoV-2), conhecida como COVID-19 (BERNAL, ANDREWS et al., 2021). No entanto, outros casos de epidemias ocorreram no mundo causando um alto índice de morbidade e mortalidade tal como o vírus da dengue no Nepal e Havaí, vírus da hepatite na Índia, o vírus da febre amarela no Brasil e as pandemias do vírus da Influenza H1N1 e do vírus ebola (RIPARI, SARTORI et al., 2021).

Vírus são estruturas organizadas de macromoléculas dependentes de células vivas para se replicar. Apresentam em sua estrutura uma casca de proteína, chamada de capsídeo, envolve um genoma que pode ser DNA ou RNA. Essa organização estrutural compõe uma partícula

viral infecciosa, conhecida por vírions. Sua estrutura é relativamente simples e não apresenta atividades metabólicas ou motoras e podem apresentar uma camada extra de proteção, a membrana lipídica, derivados da membrana das células hospedeiras, geralmente a membrana plasmática (WAGNER, HEKLETT et al., 2008; RIPARI, SARTORI et al., 2021).

A infecção e replicação viral, de maneira geral, ocorre inicialmente na aderência dos vírions através de receptores específicos presentes na membrana celular. Dentro da célula, o genoma é transportado para o local de replicação. Após esse período de replicação e síntese de proteína ocorre o processo de montagem da nova partícula viral e a saída da célula, que pode ocorrer por brotamento, exocitose controlada ou lise da célula hospedeira (CARTER e SAUNDERS, 2007; RIPARI, SARTORI et al., 2021).

Kwon, Shin et al. (2020), realizaram um estudo para avaliar a atividade antiviral do kaempferol, ácido *p*-cumárico isolados da própolis brasileira e outros oito compostos previamente conhecidos (quercetina, fisetina, galantina, crisina, luteolina, acacetina, ácido caféico e ácido ferúlico) contra o rinovírus humano (HRV-2, HRV-3 e HRV-4), causadores dos resfriados comuns em todo o mundo, usando ribavirina, fármaco de referência, como controle positivo. O kaempferol e o ácido *p*-cumárico apresentaram atividade antiviral para os três tipos de HRV estudados, sendo que o kaempferol apresentou a maior atividade antiviral comparada a ribavirina, assim como os outros oito compostos estudados e o ácido *p*-cumárico apresentou menor atividade, no entanto, inibiu o vírus HRV.

No mesmo trabalho os autores realizaram o teste de RT-PCR mostrando que o kaempferol e o ácido *p*-cumárico reduziram os níveis de replicação de RNA do HRV-3 nas células de HeLa, inibindo a infecção. Os autores sugeriram que esses compostos podem bloquear ou reduzir a entrada dos vírus na célula hospedeira no estágio inicial da infecção, evitando a destruição da célula e reduzindo a replicação viral. Os ensaios também mostraram que esses dois compostos isolados da própolis (kaempferol e ácido *p*-cumárico) foram capazes de reduzir a expressão do mRNA de ICAM-1 (glicoproteína da superfície celular, molécula de adesão intercelular-1, tipicamente expressas em células endoteliais e células do sistema imunológico) em culturas de células infectadas e não infectadas, sugerindo que o kaempferol e o ácido *p*-cumárico podem interferir na expressão de proteína deste receptor através da inibição da expressão do RNA dele, impedindo, assim, a adesão e entrada do vírus na célula hospedeira (KWON, SHIN et al., 2020).

Silva-Beltrán, Balderrama-Carmona et al. (2020), testaram o potencial antiviral do extrato etanólico da própolis brasileira vermelha e verde em duas cepas de bacteriófago. Os extratos foram preparados de forma convencional, por maceração, e por ultrassom. Os dois

extratos apresentaram atividade antiviral, sendo que o obtido pelo método adicional de ultrassom apresentou melhor resposta antiviral. O extrato da própolis vermelha se mostrou mais eficaz que o extrato da própolis verde na redução da carga viral.

Os mecanismos de ação do efeito antiviral da própolis ainda não são bem esclarecidos, no entanto, há suposições que os flavonoides podem contribuir inibindo a polimerase viral e a ligação do ácido nucléico viral ou as proteínas do capsídeo (YILDIRIM, DURAN et al., 2016; POBIEGA, GNIEWOSZ e KRAŚNIEWSKA, 2017; SILVA-BELTRÁN, BALDERRAMA-CARMONA et al., 2020).

2.8.3 Atividade antioxidante

Diariamente no organismo humano, nos processos metabólicos normais, ocorrem várias reações químicas que resultam na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), que normalmente são eliminados pela própria atividade do corpo, através de antioxidantes endógenos, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, além de cofatores enzimáticos como glutathione, ácido ascórbico e tocoferol que se ligam a esses radicais livres neutralizando-os e evitando que causem danos aos componentes celulares vitais (MACHADO, 2006; PINTO, DO PRADO e DE CARVALHO, 2011; MUSCHIETTI e MARTINO, 2014).

Nos processos metabólicos do organismo, os radicais livres funcionam como mediadores das reações bioquímicas, atuando de forma relevante no metabolismo. Porém, o excesso de ROS pode provocar efeitos deletérios no DNA, danos celulares pela peroxidação lipídica da membrana, inativação da enzima sulfidrila, como também pode estar envolvido na etiologia de diversas doenças, como doenças coronarianas, reações inflamatórias, doença de Parkinson, Alzheimer e câncer (MACHADO, 2006; RIGHI, ALVES et al., 2011; FROZZA, GARCIA et al., 2013; MUSCHIETTI e MARTINO, 2014).

Silva e colaboradores (2017) realizaram um estudo comparativo quanto a atividade antioxidante de extrato etanólicos e supercríticos da própolis vermelha, verde e marrom. As própolis extraídas em meio etanólico apresentaram melhor poder de redução, sendo considerado o método mais eficiente de extração dos compostos bioativos. Dentre os extratos etanólicos o que melhor reduziu a atividade oxidativa foi o da própolis vermelha, seguido da verde e, por fim, a marrom. Segundo esses autores a atividade antioxidante pode ser relacionada diretamente com a quantidade de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, bem

como ao isoflavonoides (MUSCHIETTI e MARTINO, 2014; ABDULLAHI, SANI et al., 2020; MARCUCCI, OLIVEIRA et al., 2020).

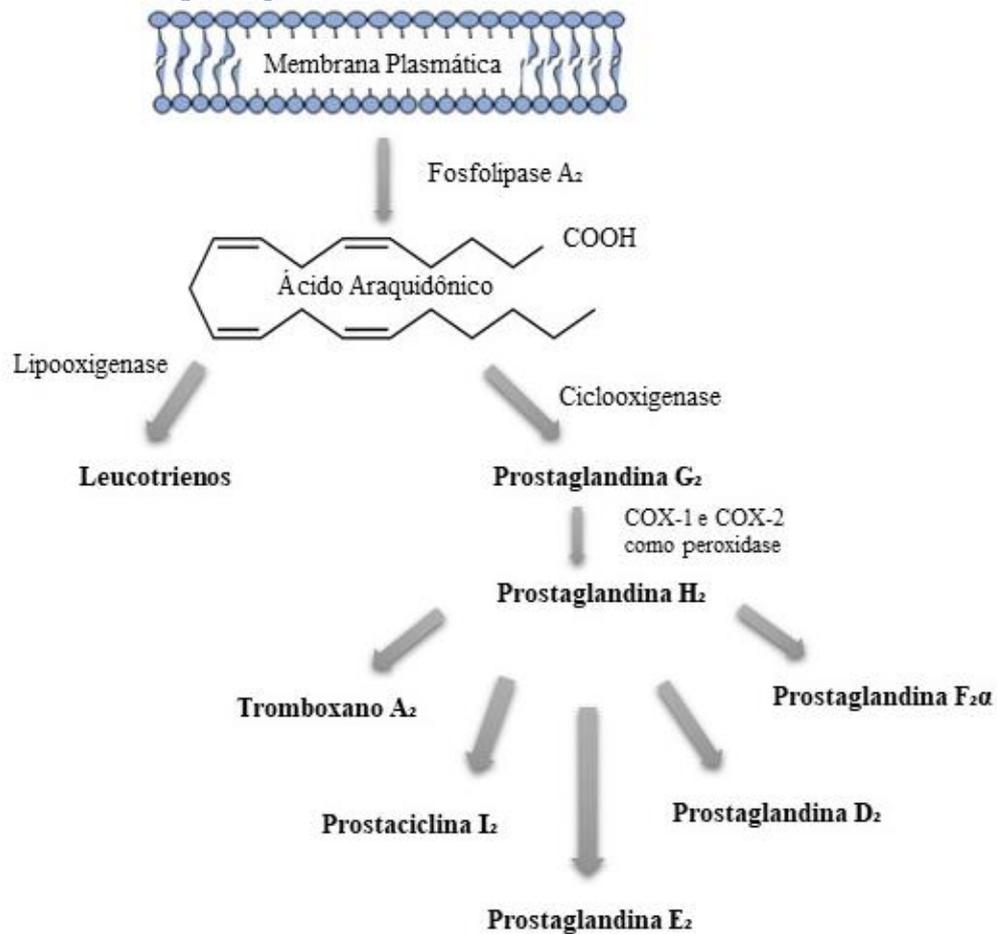
Estas substâncias são capazes de se ligar aos radicais livres inibindo a sua ação deletéria ao organismo quando em excesso. Isso ocorre devido à capacidade dessas substâncias de doarem elétrons, reagindo e inativando os ânions superóxidos, oxigênio singleto, radicais peróxidos de lipídios e/ou estabilizando radicais livres formados pelo processo oxidativo a partir da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (MACHADO, 2006; MUSCHIETTI e MARTINO, 2014).

2.8.4 Atividade anti-inflamatória

O processo inflamatório pode ocorrer através da ação de diferentes agentes inflamatórios, que podem ser químico ou biológico, como uma bactéria, vírus e/ou físico, como por exemplo, um trauma, radiação resultando na resposta de defesa do organismo através de moléculas endógenas, que são denominadas de mediadores com o papel de restaurar a homeostasia do organismo (GUYTON e HALL, 1997; SUGIMOTO, VAGO et al., 2019).

Esses mesmos mecanismos, dependendo do tempo de resposta e da intensidade, podem também causar danos ao organismo (BRITO, 2017). Quando ocorre a ação de um ou mais agentes inflamatórios, destruindo a membrada das células, que são formadas por fosfolipídios, moléculas endógenas ativam a enzima fosfolipase A₂ que por efeito cascata degrada os fosfolipídios em ácido araquidônico e, por sua vez, pode ser transformado em leucotrienos, pela enzima lipooxigenase e em prostaglandina G₂ (PGG₂), um endoperóxido intermediário, pela ação enzimática da ciclooxigenase (COX). A PGG₂ é convertida, então, pela ação da COX-1 e COX-2 agindo como uma peroxidase, em prostaglandina H₂ (PGH₂) que é convertida em vários prostanóides bioativos, o tromboxano A (TXA₂), indutor da agregação plaquetária e as prostaglandina PGE₂, PGD₂, PGF₂α e a prostaciclina I₂ (PGI₂) (Figura 23) (GUYTON e HALL, 1997; BRITO, 2017).

Figura 23. Biossíntese das prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos.



Fonte: Adaptada de BRITO, 2017.

A COX-1, que tem ação construtiva, pois a fosfolipase A₂ também recebe estímulo de natureza fisiológica assim como farmacológica e patológica (DA SILVA, 2005), atuando na manutenção da homeostase corporal. A COX-2 tem ação indutiva e quando ocorre um processo inflamatório torna-se ativa. A COX-1 está presente na maioria dos tecidos e dá origem as PGI₂, PGD₂, PGE₂, PGF₂α e TXA₂ que protegem o organismo devido às suas funções fisiológicas tais como formação do muco gástrico, protegendo a mucosa gástrica, bem como regulam a secreção ácida, mantem a homeostase vascular e o fluxo sanguíneo nos rins, regulam a agregação plaquetária, entre outros efeitos (HILÁRIO, TERRERI e LEN, 2006; BRITO, 2017). Como respostas fisiológicas ao processo inflamatório pode ocorrer a vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo local; coagulação sanguínea; edema tecidual e aumento da quantidade de células do sistema linfocitário para remediar a inflamação (GUYTON e HALL, 1997).

A propriedade farmacológica anti-inflamatória da própolis também parece estar ligada à presença dos compostos fenólicos, por apresentarem capacidade de inibir a COX e

lipooxigenase. Além disso, há relatos de que o cafeato de feniletila (CAPE) inibe a liberação do ácido araquidônico da membrana celular, suprimindo a atividade dessas enzimas, reduzindo assim a resposta inflamatória (MACHADO, 2006; LUSTOSA, GALINDO et al., 2008).

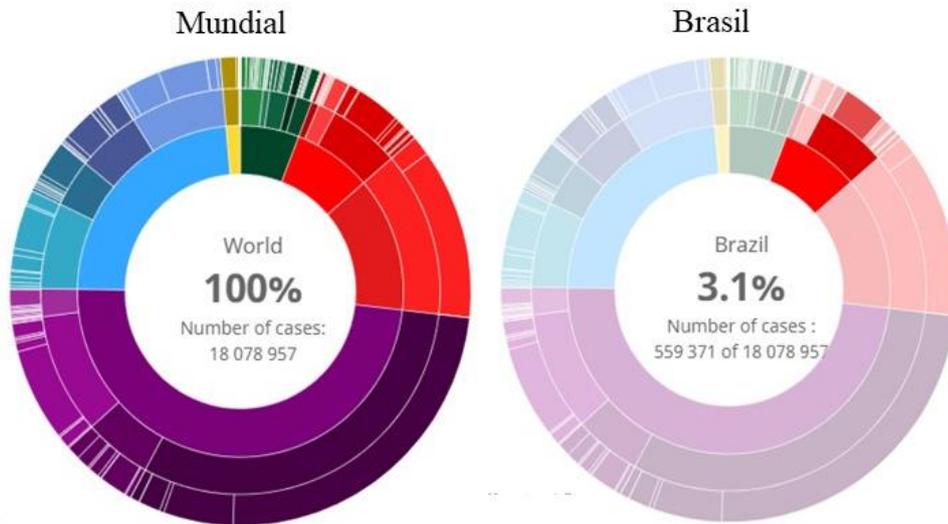
A própolis apresenta atividade anti-inflamatória por provocar a inibição da síntese das prostaglandinas e também por atuar na ativação do sistema imune. Devido à complexidade química da própolis, às vezes esta atua inibindo o sistema imunológico. Provavelmente essa imunomodulação ocorre pela ação das substâncias ativas presentes na própolis como os ácidos aromáticos e flavonoides. Sua ação provavelmente ocorre pela capacidade de ativar os macrófagos, que são um dos grupos de células responsáveis pela defesa do organismo, que agem fagocitando substâncias estranhas ao organismo, mediadores de processos inflamatórios como sinalizadores, além de secretarem várias substâncias bioquimicamente ativas tais como enzimas, citocinas e componentes do sistema complemento. Provoca também a secreção de citocina ativa principalmente o fator de necrose tumoral α (TNF- α), substâncias como o óxido nítrico (NO) e substâncias capazes de reagir com oxigênio (FISCHER, HÜBNER et al., 2008; KOSARIC, CVETKOVIC et al., 2014).

2.8.5 Atividade anticancerígena

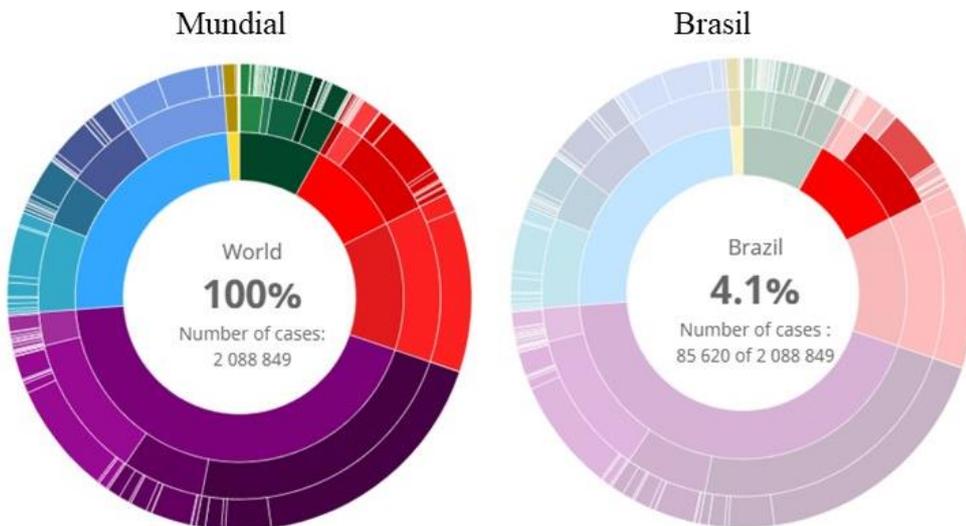
As células apresentam crescimento controlado e limitado ao seu espaço quando em condições normais, sua multiplicação como forma de construir, desenvolver e regenerar os tecidos do corpo. O câncer se origina do crescimento desordenado de células que pode ser causado por diversos fatores, que podem ser genéticos ou epigenéticos, levando a formação de células defeituosas ao nível de DNA que não conseguem desenvolver as funções que uma célula normal oferece ao nosso organismo. Bem como também não conseguem controlar o seu crescimento dando origem a mais células defeituosas e são capazes invadir outros tecidos podendo se espalhar por todo o corpo (WHO, 2020).

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo, chegando a 9,6 milhões de mortes em 2018 (WHO, 2020). O câncer de mama é, a nível mundial, o mais comum entre as mulheres (WAKS e WINER, 2019). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2020) o número estimado de casos de câncer em 2018 no mundo era de 18 078 957, sendo 559 371 (3,1%) casos no Brasil. Quanto ao número de casos de câncer de mama no mundo foram de 2 088 849 e 85 620 no Brasil, representando 4,1% da população mundial com câncer de mama (Figura 24).

Figura 24. Número de casos de câncer registrados pela Organização Mundial de Saúde em 2018.



Número de casos estimados em 2018 de câncer de mama



- Global
- África
- América Latina e Caribe
- América do Norte
- Ásia
- Europa
- Oceania

Fonte: WHO, 2020.

O câncer apresenta diferentes estágios que podem receber intervenção medicamentosa para impedir, desacelerar ou reverter o processo. Atualmente se tem estudado compostos bioativos naturais, derivados dos metabólitos secundários das plantas, buscando uma forma

segura de tratamento com baixa toxicidade para as células saudáveis. Aproximadamente 50% dos fármacos para terapia contra o câncer são de origem dos produtos naturais (VUKOVIC, OBRADOVIC et al., 2018; JIANG, RASUL et al., 2019).

Os flavonoides e os isoflavonoides apresentam propriedades que afetam a proliferação das células cancerígenas e pode ser que o uso de compostos antioxidante pode ser útil para eliminar ou reduzir à uma concentração segura os radicais livres, podendo ser usados de forma quimiopreventiva (VUKOVIC, OBRADOVIC et al., 2018; JIANG, RASUL et al., 2019).

Jiang e colaboradores (2019) relatam que o isoflavonoide, formononetina, presente na própolis vermelha apresentou capacidade de interromper o ciclo celular na fase G₀/G₁, relatou que esse mesmo composto tem a capacidade de inibir ou bloquear o crescimento de células cancerígenas por via de apoptose intrínseca e extrínseca. A apoptose é um processo ativo de morte celular com a finalidade de remover células danificadas do organismo, pode ocorrer por condensação da cromatina, fragmentação do DNA, destruição proteolítica de estruturas citoplasmáticas e nucleares e formação de corpos apoptóticos. O principal mecanismo para regular os múltiplos processos do desenvolvimento celular, incluído a morte, é realizado por proteínas quinases e fosfatases, as mais conhecidas das proteases que participam da indução da apoptose, que são as caspases. A ativação dessas proteases pode ocorrer de várias formas, dependendo do estímulo que recebem. Pode ocorrer pela ativação via receptores de morte, FAS (também chamados de CD95 ou Apo-1) e o TNF- α , pela ativação de Bax, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, ativado pela via mitocondrial e, então, causam o surgimento de alterações celulares, caracterizando a apoptose (ANAZETTI e MELO, 2007). Assim, a formononetina pode ativar as caspases através do aumento de ROS induzindo a ruptura da membrana celular, que promove a ativação de Bax, dentre outros eventos que envolvem a apoptose celular (JIANG, RASUL et al., 2019).

Em outro estudo foi apresentada a atividade anticancerígena de dois isoflavonoides isolados da própolis vermelha, o vestiol e o neovestiol, apresentando IC₂₀ de 214,7 μ M e 102,9 μ M, respectivamente. Segundo os autores, o vestiol reduz a quantidade de α -tubulina e a histona H₃ e o neovestiol reduz a formação do gene prostaglandina E sintase (PGES), que são alvos importantes para o tratamento do câncer. Como por exemplo, as tubulinas tem a função importante na divisão celular, dividindo de forma igual o material genético entre as duas estruturas que estão sendo formadas. Em casos de células cancerígenas a intenção é impedir a divisão celular e reduzir a ação das tubulinas podendo efetivar o bloqueio da progressão celular. Já as histonas H₃ mantem a condensação do DNA durante a mitose permitindo a formação de duas células filhas iguais. No caso das PGES, que é uma enzima responsável pela formação da

PGE₂, que atuam nos tecidos inflamados como mediador da sensibilização inflamatória à dor e a patologias como o câncer. As PGES, segundo os autores, são moduladas pelo fator de transcrição NF- κ B, e podem ter a atividade diminuída pela ação do neovestiol, que conseqüentemente, reduz a formação das PGES e, assim, reduz o processo inflamatório nas células cancerígenas levando-as à morte (NANI, FRANCHIN et al., 2018).

2.8.6 Atividade leishmanicida

A leishmaniose é uma doença infecciosa, causada por parasitos do gênero *Leishmania*, é uma doença negligenciada que ocorre principalmente em países subdesenvolvidos. É considerada um agente etiológico que acentua a taxa de mortalidade. A transmissão dessa doença ocorre através da picada de flebotomíneos infectados, no momento da hematofagia, realizada, exclusivamente, pela fêmea. Para controlar a leishmaniose é necessário fazer o diagnóstico seguido do tratamento e da tentativa de controlar o desenvolvimento do vetor. O diagnóstico sorológico pode ser realizado através de teste de ELISA, imunofluorescência indireta, aglutinação direta e exame parasitológico através de punção de medula óssea, baço e nódulos linfáticos para leishmaniose visceral e leishmaniose mucocutânea, em caso de leishmaniose cutânea o diagnóstico é feito por esfregaço do material coletado das lesões e por cultura do parasito. Os fármacos convencionalmente utilizados para o tratamento dessa doença são os de primeira linha, os antimoniais pentavalentes. Para leishmaniose visceral também podem ser utilizados fármacos de segunda linha, como as anfotericina B e anfotericina B lipossomal. Estes fármacos apresentam alta toxicidade e possuem baixa eficácia, tendo sua potencialidade reduzida ao longo do tempo devido ao desenvolvimento de resistência dos parasitas a estes fármacos (MICHALICK, 2005; DA ROCHA, 2006; AYRES, MARCUCCI e GIORGIO, 2007).

Com o objetivo de desenvolver medicamentos mais eficazes e com faixa terapêutica larga, melhorando a resposta terapêutica e reduzindo o risco de toxicidade dos pacientes sujeitos ao tratamento, estudos com produtos naturais são de suma importância para a criação de fitoterápico que provavelmente modificará a alta taxa de mortalidade e reduzirá o problema do desenvolvimento de cepas resistentes aos fármacos convencionais. Alguns extratos de própolis foram testados contra *Leishmania* e demonstraram valores relevantes de atividade leishmanicida. Duran et al. (2011) mostraram atividade leishmanicida do extrato de dois tipos de própolis da Turquia, própolis “Hatay” e própolis “Bursa”, que demonstraram uma IC₅₀ de 250 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e 500 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Outro estudo relevante realizado por Duran et al. (2008) revelou

bons resultados da atividade da própolis “Adana”, também originária da Turquia, contra leishmaniose na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Outro tipo de extrato de própolis da Turquia, a própolis Kayseri, estudada por Ozbilge et al. (2010) contra *Leishmania tropica* mostrou diminuição da motilidade celular do parasita a partir da concentração de $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de própolis e na concentração de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou acima desta foi observado imobilidade total.

Extratos de própolis verde do Paraná e Minas Gerais e de própolis vermelha de Alagoas (PVA) foram analisados em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Este estudo demonstrou que ocorreu redução da percentagem de infecção e da quantidade intracelular de parasitas nos macrófagos infectados e tratados com o extrato da própolis verde do Paraná na concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ após 72 horas. Quando testadas concentrações mais elevadas, os extratos mostraram intoxicação celular. O tratamento com a própolis vermelha, na concentração de $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ após 72 horas, mostrou redução de 84,5% do nível de infecção, sendo o extrato mais ativo, e em concentrações mais altas do extrato nenhum o macrófago apresentou infecção. O extrato de própolis vermelha de Alagoas também foi avaliado tratando culturas infectadas durante 1, 2 e 3 dias na concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e foi observada diminuição tempo-dependente da percentagem de infecção e da proliferação intracelular do parasito (AYRES, MARCUCCI e GIORGIO, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de sílica mesoporosas do tipo MCM-41 para carrear própolis vermelha e avaliar suas propriedades terapêuticas *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de MCM-41;
- Carrear o extrato de própolis vermelha (EPV) nas nanopartículas (MCM-41/Pr);
- Determinar a formação da estrutura de mesoporos por meio de Difração de Raio-X de baixo ângulo (DRX);
- Caracterizar MCM-41 e MCM-41/Pr morfologicamente por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Realizar a caracterização física da MCM-41 e MCM-41/Pr através de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e análise térmica através de Termogravimetria (TG);
- Realizar a caracterização de tamanho de poro, distribuição de poro, volume de poro utilizando a técnica de Brunauer, Emmett, Teller/Barrett, Joyner, Halenda (BET/BJH);
- Avaliar a eficiência de encapsulação do EPV no sistema nanoparticulado utilizando Cromatografia Líquida de Ultraeficiência (UPLC-DAD);
- Realizar teste de dissolução *in vitro* do EPV presente na MCM-41 em solução tampão no pH de 5,5, 7,2, 7,4 e 7,6;
- Determinar a atividade antioxidante da própolis no sistema nanoparticulado através do emprego do radical DPPH;
- Analisar a atividade antimicrobiana por meio de difusão em poço e CIM;
- Determinar a viabilidade celular das amostras MCM-41, MCM-41/Pr e EPV e
- Avaliar a capacidade antiviral contra o vírus Chikungunya.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O extrato de própolis vermelha (EPV) (90 mL, 11% m/V) foi adquirido no apiário “O Cortiço” (Maceió, AL, Brasil). O tetraetoxissilano 99% (TEOS), brometo de n-cetil-n, n, n trimetil amônio (CTAB) e hidróxido de amônio (NH₄OH, 25-28% em peso). foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Acetonitrila e metanol de qualidade HPLC foram adquiridos na J.T. Baker Mallinckrodt-Avantor (Nova Jersey, EUA).

4.2 Métodos

4.2.1 Síntese das nanopartículas de sílica mesoporosas do tipo MCM-41

A MCM-41 foi preparada pelo método sol-gel como descrito por Gan et al. (2015), com algumas modificações. Inicialmente, 500 mL de água deionizada foram aquecidos em banho maria a $50 \pm 1^\circ\text{C}$ (Fisatom, 752A) até sua estabilidade ser atingida. Somente então, foram adicionados hidróxido de amônio até o pH 11 e o surfactante CTAB. A solução foi mantida sob agitação mecânica, na rotação de 600 ± 10 rpm durante 15 min para homogeneização completa do sistema. Em seguida, TEOS foi adicionado gota a gota mantendo a agitação e a temperatura por 2 horas. Subsequentemente, a solução resultante foi centrifugada a 8000 rpm por 5 minutos e lavada duas vezes com água deionizada e uma vez com etanol, neutralizando o pH. Finalmente, o precipitado foi seco a 80°C durante 24 horas. Posteriormente, foi realizada a remoção do direcionador da estrutura de sílica, o CTAB, pelo método de calcinação em que a amostra foi submetida, à temperatura de $550 \pm 5^\circ\text{C}$ por 4 horas, sob ar atmosférico, com uma taxa de aquecimento de $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Após esse tempo, as partículas de MCM-41 foram obtidas.

4.2.2 Processo de adsorção do EPV pela MCM-41

Para a incorporação do EPV nas partículas de MCM-41 foram pesados 100 mg de MCM-41 e adicionados a 5 mL da solução de EPV a 11% (m/V). A solução foi mantida sob agitação magnética em aproximadamente 100 rpm durante 24 horas. Após esse tempo, a solução foi centrifugada na velocidade de 5000 rpm durante 5 min e o precipitado foi coletado

e levado à estufa a 40°C até estar totalmente seco e, desta forma, obteve-se o sistema nanoparticulado com a própolis vermelha sorvida (MCM-41/Pr).

4.3 Caracterização

4.3.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados de FTIR da própolis vermelha, MCM-41, MCM-41/Pr, foram obtidos empregando-se um espectrômetro de FTIR (Modelo IRPretige-21, Shimadzu, Kyoto, Japão) na faixa de 400 - 4000 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} , com 120 medidas, no modo transmitância, à temperatura ambiente. As medidas foram realizadas utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr). As medidas foram realizadas no Laboratório de Caracterização e Microscopia de Materiais do Instituto de Física (IF) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Esta técnica de FTIR foi empregada a fim de investigar os grupos funcionais e ligações químicas presentes nas amostras (PAVIA, LAMPMAN e KRIZ, 2013).

4.3.2 Difração de Raios-X de Baixo Ângulo (DRX)

A difração de raios-X de baixo ângulo foi empregada a fim de investigar a fase cristalina, simetria e arranjo cristalográfico das nanopartículas de MCM-41. Os resultados foram obtidos utilizando-se um difratômetro de raios-X (XRD-6000, Shimadzu, Kyoto, Japão) com fonte de radiação de $\text{CuK}\alpha 1$ ($\lambda = 1,79 \text{ \AA}$). Os parâmetros utilizados foram: corrente de 30 mA e tensão de 30 kV, faixa de 1 a 70° com taxa de 2° min^{-1} , modo contínuo e temperatura ambiente. As medidas foram realizadas no Laboratório de Síntese de Catalisadores (LSCat) do Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) da UFAL.

4.3.3 Termogravimetria (TG)

As curvas de TG da própolis vermelha, MCM-41 e MCM-41/Pr foram obtidas utilizando-se um aparelho termoanalítico (TGA 50H, Shimadzu, Tóquio, Japão) empregando-se a massa de amostra em torno de 5,0 mg \pm 10% em cadinhos, razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ na faixa de temperatura de 30 a 900°C. A atmosfera do forno foi saturada com nitrogênio, a uma vazão constante de 50 mL.min⁻¹. O equipamento foi calibrado com as mesmas condições utilizando-se o padrão de oxalato de cálcio monohidratado.

4.3.4 Isotermas de Adsorção-Dessorção de Nitrogênio

Uma isoterma de adsorção é obtida medindo-se quantidade de gás adsorvido em uma superfície sólida em função do aumento da pressão relativa a uma temperatura constante, normalmente o gás utilizado é o nitrogênio, enquanto que a isoterma de dessorção é obtida medindo-se o gás que está sendo removido da superfície em função da diminuição da pressão relativa do gás. A área superficial é o meio em que um sólido interage com o sistema no seu entorno, podendo ser um líquido ou um gás em sua área externa, o que inclui a superfície atribuído aos poros. O aumento da área de contato pode ser dado pela redução do tamanho das partículas e/ou pelo aumento da porosidade do sólido. Esta propriedade dos materiais sólidos é tipicamente determinada pelo cálculo do volume do gás que é adsorvido fisicamente em uma camada monomolecular da superfície do sólido (NADERI, 2015).

A adsorção de superfície pode ocorrer pelo mecanismo de fisiossorção, em que a interação intermolecular é física envolvendo forças de van der Waals, relativamente fracas, necessitando pouca energia para a interrupção da interação, portanto, esse mecanismo de adsorção é reversível e a dessorção pode ser induzida pelo aumento da temperatura ou redução da pressão de vapor ou, ainda, por agitação. A adsorção também pode ocorrer pelo mecanismo de quimiossorção, onde a interação ocorre por meio de ligações químicas, que são interações mais fortes e necessitam de maior energia para serem rompidas. É pela interação por fisiossorção que várias informações importantes dos materiais são fornecidas, tais como, área superficial, tamanho dos poros e distribuição do tamanho dos poros (NADERI, 2015; THOMMES, KANEKO et al., 2015).

A caracterização das amostras MCM-41 e MCM-41/Pr foi realizada construindo-se a isoterma de adsorção-dessorção com gás nitrogênio na superfície destas, na faixa pressão relativa (P/P_0) de 0,01 a 1,0, no equipamento NOVA 2200e (Quantachrome Instrument) a -196 °C. Antes das medições, 0,1 g das amostras foram tratadas termicamente a 70 °C sob vácuo por 5 horas. As áreas superficiais das amostras foram calculadas empregando-se o modelo matemático desenvolvido pelos cientistas Brunauer-Emmett-Teller (BET) (DA SILVEIRA, 2013). O diâmetro dos poros e a distribuição de tamanho dos poros foram determinados pelo modelo matemático proposto por Barrett-Joyner-Halenda (BJH) (SALVIANO, 2017).

4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia e o tamanho das partículas da MCM-41 e MCM-41/Pr foram investigadas através das imagens de MEV (Superscan SSX-550, Shimadzu, Kyoto, Japão), operando no modo de retroespalhamento a uma tensão de aceleração de 10,0 kV. As amostras foram preparadas em solução hidroalcolica (80%), colocadas diretamente no porta amostra, secas a temperatura ambiente e revestidas com uma fina camada de ouro, utilizando-se o sistema de metalização Sanyu Electron, modelo Quick Coater SC-701, sob corrente de voltagem durante o processo de metalização de 10 mA por 7 minutos.

4.3.6 Análise por Cromatografia Líquida de Ultraeficiência (UPLC-DAD)

A identificação e quantificação dos marcadores químicos presentes no extrato de própolis vermelha e no MCM-41/Pr, foram realizadas utilizando-se um cromatógrafo líquido UPLC-DAD (Shimadzu, Kyoto, Japão) contendo um módulo de bomba de alta pressão (LC-20ADXR), desgaseificador (DGU-20A3R), módulo auto injetor (SIL-20AXR), módulo de forno para coluna de cromatógrafo, módulo com detector de arranjo de diodos (EPDM-20A), módulo com detector de fluorescência (RF-20A) e controlador (CBM-20A). A separação dos flavonoides foi realizada utilizando-se uma coluna em fase reversa (Phenomenex C18, 150 x 4,6 mm; 5 µm). Para a fase móvel, foi utilizada água deionizada como solvente A e acetonitrila como solvente B, bombeada a uma vazão de 0,3 mL.min⁻¹, com o gradiente de eluição mostrado na Tabela 3. A metodologia analítica foi seguida de acordo com Azevedo et al. (2018).

Tabela 3. Gradiente de eluição do solvente durante a análise UPLC-DAD.

Tempo (min)	% de água	% de acetonitrila
0	70	30
2	70	30
5	64	36
8	58	42
11	42	48
14	46	54
17	40	60
20	34	66

24	28	72
28	22	78
32	16	84
36	10	90
40	0	100
53	0	100
54	70	30
60	70	30

Fonte: Autor, 2020.

A identificação e quantificação da própolis vermelha no MCM-41 foi mensurada pela injeção no cromatógrafo de 7 marcadores (liquiritigenina, daidzeína, isoliquiritigenina, formononetina, biochanina A, pinocembrina e pinobanksina) (*Sigma Aldrich*), presentes no extrato de própolis vermelha do Brasil e correlacionados à curva de calibração desses padrões previamente traçados em estudos anteriores (AZEVEDO, SILVA et al., 2018). Para a medição, foram pesados 100 mg de extrato etanólico de própolis vermelha e solubilizados em 10 mL de etanol absoluto em banho ultrassônico por 10 min obtendo-se a concentração de 10 mg.mL⁻¹. A partir desta, uma solução estoque foi preparada com a concentração de 1 mg.mL⁻¹. E, finalmente, preparada uma solução na concentração de 310 µg.mL⁻¹ para então ser injetada no volume de 2 µL. Antes da injeção, a solução foi filtrada usando papéis de filtros de seringa de 0,22 µm (K18-230). O mesmo procedimento foi repetido para o MCM-41/Pr.

4.3.7 Ensaio de Dissolução MCM-41/Pr

Para o estudo de liberação *in vitro* da própolis encapsulada nas partículas de sílica, foram pesados 17 mg de MCM-41/Pr e dispersos em 50 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) com diferentes valores de pH (5,5, 7,2, 7,4 e 7,6). O ensaio foi realizado durante 24 horas sob agitação a 100 rpm, mantendo-se a temperatura constante a 37 ± 1 °C. As amostras foram coletadas após decorridos os tempos de 15 ', 30', 45 ', 1h, 1h30', 2h, 3h, 4h, 8h, 12h e 24h. Depois de coletar 1 mL da de PBS contendo os analito nos tempos mencionados, a solução foi centrifugada por 5 min a 10.000 rpm e feita a leitura em espectrofotômetro UV-vis (Modelo UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 280 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Antes do ensaio de liberação *in vitro*, foi feita uma curva de calibração do extrato de própolis vermelha, permitindo correlacionar o valor da absorbância com a concentração do analito na solução, através da equação da reta. A curva de calibração foi realizada com extrato de própolis vermelha em triplicata nas concentrações de 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 e 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($r^2 = 0,9991$). Os valores de absorbância foram medidos em um espectrofotômetro UV-visível a no comprimento de onda de 280 nm.

Dois modelos foram utilizados para ajustar os dados cinéticos experimentais e tentar explicar o mecanismo de liberação do fármaco: o modelo de pseudo primeira ordem, proposto por Lagergren e o modelo de pseudo segunda ordem, projetado por Ho e McKay. O coeficiente de determinação (R^2) e o erro relativo médio (ARE) foram usados para medir a confiabilidade dos modelos. A equação de pseudo primeira ordem é (OLIVEIRA, OLIVEIRA et al., 2020):

$$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t}) \quad (3)$$

onde k_1 é a constante da taxa de liberação de própolis vermelha de pseudo primeira ordem (h^{-1}), q_e ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e q_t ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) são as quantidades de própolis vermelha liberadas por mL da solução tampão no ponto de equilíbrio e em um tempo específico, respectivamente, e t é o tempo do processo. A equação de pseudo segunda ordem é (OLIVEIRA, OLIVEIRA et al., 2020):

$$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t} \quad (4)$$

onde k_2 é a constante da taxa de liberação de própolis vermelha de pseudo segunda ordem ($\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

O primeiro modelo sugere que a taxa de liberação do soluto é proporcional ao número de sítios ativos presentes na estrutura da nanopartícula de sílica, indicando que tal interação é reversível. O segundo modelo propõe que a capacidade de liberação de bioativos é diretamente proporcional ao número de sítios ativos ocupados na nanoestrutura de sílica mesoporosa. Além disso, também sugerem a presença de interações químicas, indicando alguma dificuldade de reversibilidade (OLIVEIRA, OLIVEIRA et al., 2020).

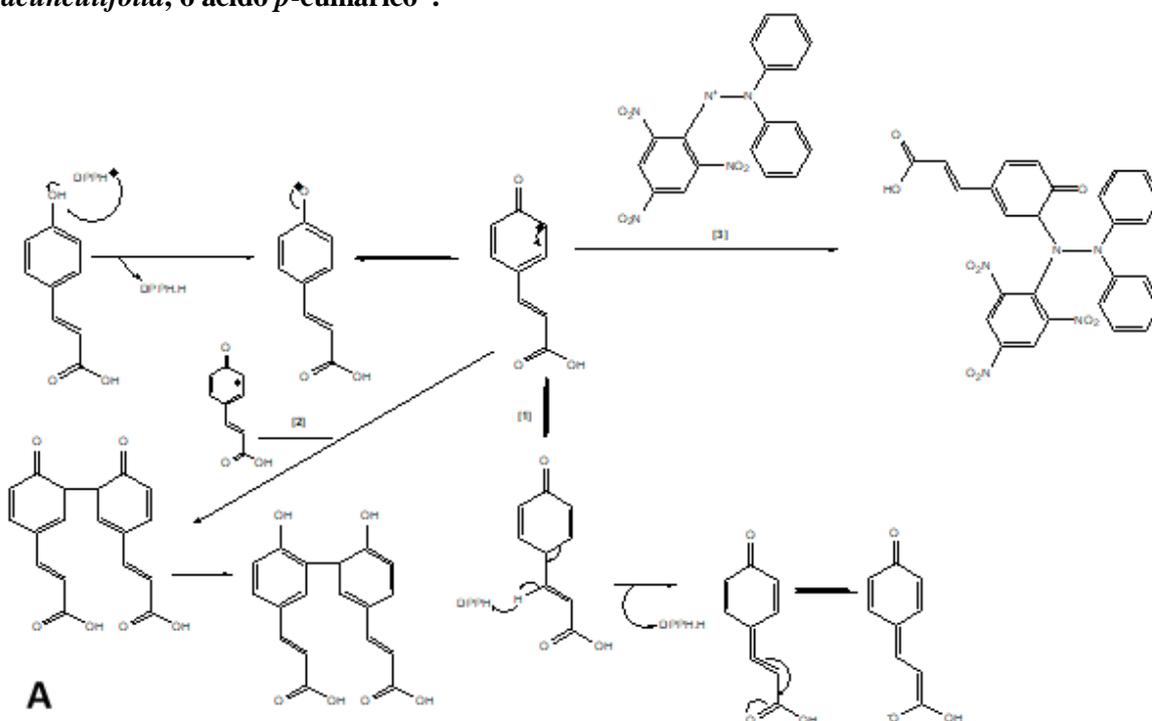
4.4 Atividade Biológica *In vitro*

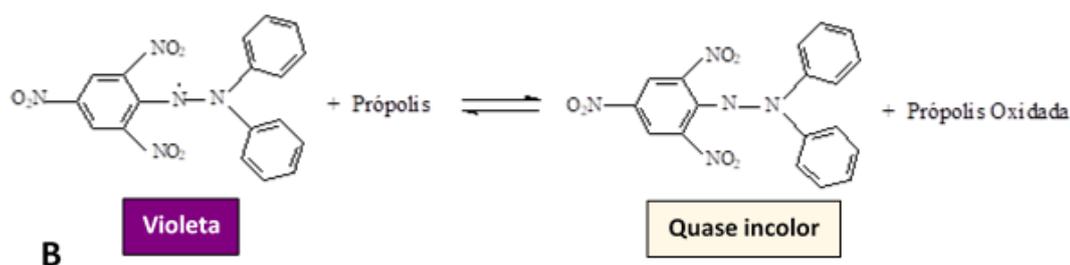
4.4.1 Atividade Antioxidante do EPV e MCM-41/Pr pelo método DPPH

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante EPV e da MCM-41/Pr foi realizada pelo método de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) de acordo com os métodos descritos na literatura (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995; VEIGA, DE MENDONÇA et al., 2017).

O radical DPPH é um cromóforo estável à temperatura ambiente com coloração violeta intensa em etanol com absorção de comprimento de onda de 517 nm. À medida que este radical encontra antioxidantes acontece o emparelhamento de elétrons e diminuição da coloração e, conseqüentemente, diminuição da absorvidade (CABRAL, OLDONI et al., 2009; MARCUCCI, OLIVEIRA et al., 2020) (Figura 25). A capacidade da formulação nanoencapsulada de sequestrar o radical livre DPPH foi avaliada pela redução da coloração das amostras.

Figura 25. Ilustração da reação do DPPH com um dos componentes da própolis de *Baccharis dracunculifolia*, o ácido *p*-cumárico*.





Fonte: Marcucci, Oliveira et al. (2020).

A atividade antioxidante foi medida a partir da inibição do radical livre DPPH[•] e monitorada pela obtenção dos valores de absorvância das soluções das amostras com diferentes concentrações. A equação usada para calcular a atividade antioxidante foi a seguinte:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = 100 - \frac{ABS_{amostra} - ABS_0}{ABS_{controle}} \times 100 \quad (5)$$

Onde $ABS_{amostra}$ representa a absorvância da solução da amostra com DPPH; ABS_0 , absorvância da amostra sem DPPH; e $ABS_{controle}$, absorvância da solução de DPPH.

A solução de DPPH (3 mM) foi preparada usando 0,005 g de reagente radical 2,2-difenil-1-picri-hidrazil (DPPH[•]) e foi solubilizada em um balão volumétrico de 100 mL com etanol absoluto. O EPV e a MCM-41/Pr foram preparados em uma concentração inicial de 1,0 mg.mL⁻¹ de própolis vermelha no solvente etanol. Alíquotas de 500, 375, 250, 125, 50, 25, 5 e 2,5 µL foram transferidas para balões volumétricos de 5 mL e adicionados 2,0 mL de solução DPPH (3 mM) e depois diluídas com etanol para concentrações finais de 100, 75, 50, 25, 10, 5, 1 e 0,5 µg.mL⁻¹, respectivamente. A reação foi realizada na ausência de luz a 25 ± 1°C por 30 min. As leituras de absorvância foram realizadas com um espectrofotômetro (Modelo UV-1280, Shimadzu, Kyoto, Japão) no comprimento de onda de 517 nm. O etanol absoluto foi utilizado como branco.

4.4.2 Atividade Antibacteriana de EPV e da MCM-41/Pr

A avaliação da atividade antimicrobiana do MCM-41/Pr e do EPV foi determinada pelo método da difusão em poço com diâmetro de ~ 8 mm. Este método é similar ao método de difusão em disco e amplamente utilizado para determinação da atividade antibacteriana de produtos naturais ou relacionados (DAMIAN e PATACHIA, 2014). A bactéria *Staphylococcus*

aureus (*S. aureus*) ATCC 25923 foi usada para verificar o perfil de sensibilidade do extrato após encapsulado e da própolis vermelha na forma livre nas concentrações de 150, 225, 375, 500, 750 e 1050 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em DMSO. Esta cepa de *S. aureus* foi previamente cultivada em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) por 18 - 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e desta cultura uma colônia foi removida para subsequente semeadura em ágar Müeller Hinton. Cerca de 300 μL da suspensão das diferentes concentrações de MCM-41/Pr e extrato de própolis vermelha foram inoculados em poços previamente preparados em placas de ágar Müeller Hinton. A leitura dos halos foi realizada após 24 horas de incubação das placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. O controle negativo foi realizado seguindo o mesmo procedimento de diluição usando apenas o MCM-41.

A atividade antimicrobiana da MCM-41, MCM-41/Pr e EPV também foi realizada por meio do teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), segundo as diretrizes do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018) para bactérias (M07-A10). As cepas padrão utilizadas foram: *S. aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

Antes da realização dos experimentos, as cepas bacterianas liofilizadas foram previamente inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas por 18-24 horas em estufa microbiológica. Decorrido o período de incubação, uma alíquota de cada amostra foi semeada, por meio da técnica de esgotamento, em placas de Petri contendo ágar Müeller Hinton (AMH) e novamente incubadas por 18-24 horas. A suspensão do inóculo foi preparada selecionando várias colônias morfológicamente semelhantes do crescimento prévio em AMH e suspendendo em solução salina estéril (0,85%), ajustando a suspensão por meio da comparação com um padrão de turbidez da escala 0,5 de McFarland, que corresponde a uma concentração entre $1-2 \times 10^8$ UFC. mL^{-1} . Em seguida, a suspensão resultante foi agitada em vórtex e diluída em uma proporção de 1:10, para se conseguir uma diluição de 10^7 UFC. mL^{-1} , sendo a concentração final desejada de 5×10^5 UFC. mL^{-1} , ao inocular 5 μL do inóculo em cada poço da microplaca (CLSI, 2018).

Para o ensaio com bactérias foi utilizado caldo Müeller-Hinton não suplementado, conforme CLSI (2017) e CLSI (2018).

O meio de cultura Müeller Hinton (MH – Difco, Brasil) foi preparado de acordo com as recomendações do fabricante. O caldo foi esterilizado em autoclave (calor úmido), à temperatura de 121°C , durante 15 min, em vapor constante.

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 cavidades com fundo em forma de "U", contendo 12 colunas enumeradas de 1-12 e 8 linhas marcadas de A-H. Todos os orifícios da microplaca foram preenchidos inicialmente com 100 μL de caldo de cultivo (MH). Em

paralelo, nas colunas de 1 a 9 da linha A da microplaca foram desferidas alíquotas de 100 μL dos produtos testados, preparados na concentração de 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em seguida, uma alíquota de 100 μL do conteúdo de cada orifício da linha A foi transferida para os orifícios da linha B, e após homogeneização, o mesmo volume foi transferido para a linha C, repetindo-se este procedimento até a linha H, e desprezando-se após homogeneização o excesso da diluição, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ -linha A; 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ -linha B; 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ -Linha C, e assim por diante).

As colunas 1-3 foram reservadas para o EPV, 4-6 para MCM-41 e 7-9 MCM-41/Pr. As fileiras 10, 11 e 12 foram destinadas, respectivamente, para o controle negativo (CN) da atividade inibitória do diluente DMSO 2%, utilizado na solubilização do extrato e nanopartícula; controle de crescimento (CC) ou de viabilidade dos microrganismos utilizados; e controle de esterilidade (CE) da placa. Paralelamente, o controle positivo foi realizado numa placa a parte utilizando-se ciprofloxacino.

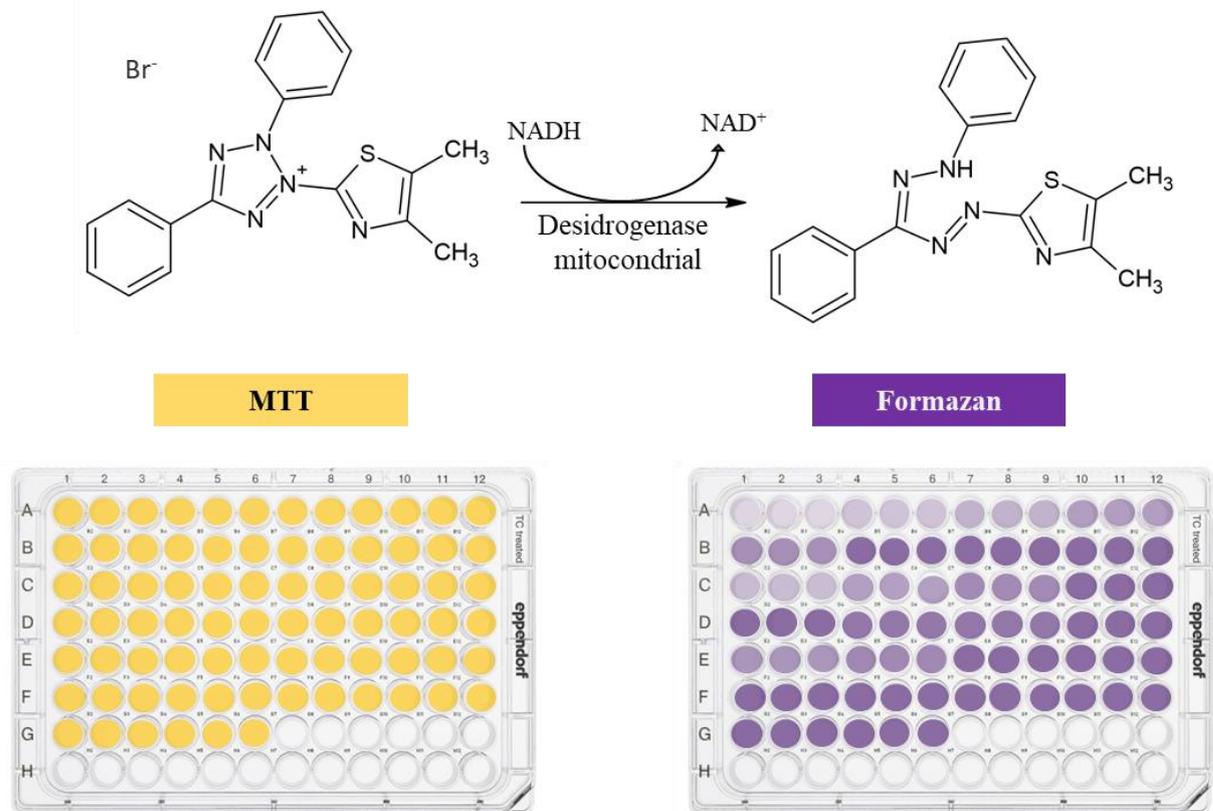
Transcorrido o período de incubação, foi realizada leitura das placas. A CIM foi definida como a menor concentração dos produtos testados capaz de inibir visualmente o crescimento verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Para facilitar a realização da leitura das cepas bacterianas, foi utilizado revelador Brometo de 2,3,5-Trifeniltetrazólio a 0,5%, que indica crescimento microbiano. Para isto, foi inoculado 20 μL de uma solução aquosa do revelador em todos os poços e, em seguida, as microplacas foram reincubadas por um período de 3 horas a 35°C. Após este período, as mesmas foram observadas e analisadas. A ausência de cor nos poços foi interpretada como microrganismo sensível ao extrato testado (ausência de crescimento). De modo contrário, os poços que apresentaram coloração azulada foram interpretados como microrganismo resistente (presença de crescimento). Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.4.3 Viabilidade Celular

Antes da realização dos testes antivirais foi realizado o ensaio de citotoxicidade dos materiais em células Vero E6, que são fibroblastos de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (AHMETAJ-SHALA, P. PEACOCK et al., 2020; GOMES, MOYSÉS et al., 2021). O ensaio foi realizado pelo método colorimétrico do MTT [3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio] de acordo com protocolos determinados por Mosmann (1983) seguindo segundo modificações propostas por Sieuwerts, Klijn et al. (1995).

O MTT é um sal hidrossolúvel que por atividade de desidrogenases mitocondrial, de células viáveis, é reduzido formando cristais de sal de formazan (Figura 26). O formazan fica armazenado no citoplasma da célula viável que apresentam a coloração roxa onde é solubilizado pelo dimetilsulfoxido (DMSO). A viabilidade mitocondrial, que equivale a viabilidade celular, é quantificada através dessa reação de redução realizadas pelas enzimas desidrogenases e obtenção dos valores de absorbância no comprimento de onda na região do azul (492 nm) (MAGALHÃES, THÁ e LEME, 2018).

Figura 26. Reação de redução do MTT a Formazan.



Fonte: Autor, (2021).

Para realizar o ensaio de citotoxicidade, monocamadas confluentes de células Vero E6 em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 /poço foram tratadas com diferentes concentrações dos materiais teste em triplicata (Tabela 4) por 48h a 37°C e atmosfera de CO_2 a 5%.

Tabela 4. Concentrações dos materiais para realização do ensaio de viabilidade celular.

MCM-41	MCM-41 + Pr	EPV
2833,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	2833,33 + 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
1416,67 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1416,67 + 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
708,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	708,33 + 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
354,17 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	354,17 + 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
177,08 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	177,08 + 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
88,54 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	88,54 + 15,63 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	15,63 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
44,27 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	44,27 + 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
22,14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	22,14 + 3,91 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	3,91 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Fonte: Autor (2021).

Em cada poço foram adicionados 20 μL da solução de MTT na concentração de 5 mg.mL^{-1} e incubada por 3 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionado 150 μL de DMSO e incubado por mais 15 min. A absorbância de cada poço foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm. A porcentagem da viabilidade celular foi calculada utilizando-se os valores da absorbância obtidas aplicando-se a fórmula a seguir:

$$\text{Viab. Celular (\%)} = \frac{Abs_{amostra} - Abs_{Branco}}{Abs_{Controle Celular} - Abs_{Branco}} \times 100 \quad (6)$$

onde $Abs_{amostra}$ é o valor da absorbância do meio contendo as células e a amostra que está sendo analisada, Abs_{branco} é o valor da absorbância do meio que foi utilizado e $Abs_{Controle Celular}$ é o valor da absorbância do meio contendo apenas as células.

A partir da determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT) foi realizado o ensaio de avaliação da atividade antiviral.

4.4.4 Atividade Antiviral Contra o Vírus Chikungunya

O vírus Chikungunya é o agente etiológico da febre Chikungunya que frequentemente vem acompanhada de dor de cabeça, erupções maculopapulares, dor nas costas, mialgia e poliartralgia. É um arbovírus, pois é transmitido através da picada da fêmea do mosquito infectado comumente com as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, que também são vetores do vírus da dengue e da Zika (WHO, 2021).

É considerado um vírus endêmico em regiões tropicais, mas não é frequentemente uma doença fatal. No entanto, é caracterizada por causar uma febre abrupta entre o 4º e 7º dias após a picada do mosquito infectado, que normalmente vem acompanhada por artralgia, a qual costuma ser debilitante e pode durar dias, algumas semanas e, em alguns casos, anos, resultando em incapacidade de longo prazo (WHO, 2021). Manifestações clínicas como insuficiência respiratória e meningoencefalite também podem ocorrer, geralmente em idosos, com potencial causa de mortalidade (GOH, MOK e CHU, 2020).

O vírus Chikungunya (CHIKV) foi isolado a partir de amostras de soro obtidas de pacientes infectados (confirmado por PCR em tempo real) na fase virêmica gentilmente cedidas pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Alagoas (LACEN/AL) em um projeto anterior do grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisas em Imunologia e Virologia (Lapevi) (PPSUS 60030 000841/2016; Projeto submetido e aprovado junto ao CEP/UFAL C.A.A.E. 59229716.9.0000.5013).

As células Vero E6 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2×10^4 /poço e infectadas com o CHIKV durante um período de 2h para que os vírus fossem adsorvido pelas células. Após esse período, as células foram lavadas com solução tampão fosfato (PBS) e as monocamadas infectadas foram tratadas com diferentes concentrações de MCM-41, MCM-41/Pr e EPV, partindo da CMNT. Foram então incubadas por 48 h a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%, seguindo-se a metodologia da viabilidade celular. A percentagem de inibição foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Inibição Viral (\%)} = \frac{Abs_{Amostra} - Abs_{Controle Viral}}{Abs_{Controle Celular} - Abs_{Controle Viral}} \times 100 \quad (7)$$

onde $Abs_{amostra}$ é o valor da absorbância do meio contendo as células e a amostra que está sendo analisada, $Abs_{Controle Viral}$ é o valor da absorbância do meio contendo as células infectadas com o vírus e $Abs_{Controle Celular}$ é o valor da absorbância do meio contendo apenas as células.

As concentrações que inibiram 50% da ação viral (IC₅₀) foram calculadas por regressão não-linear e construção de uma curva sigmoideal pela análise de curva log de inibição vs resposta variável *slope*.

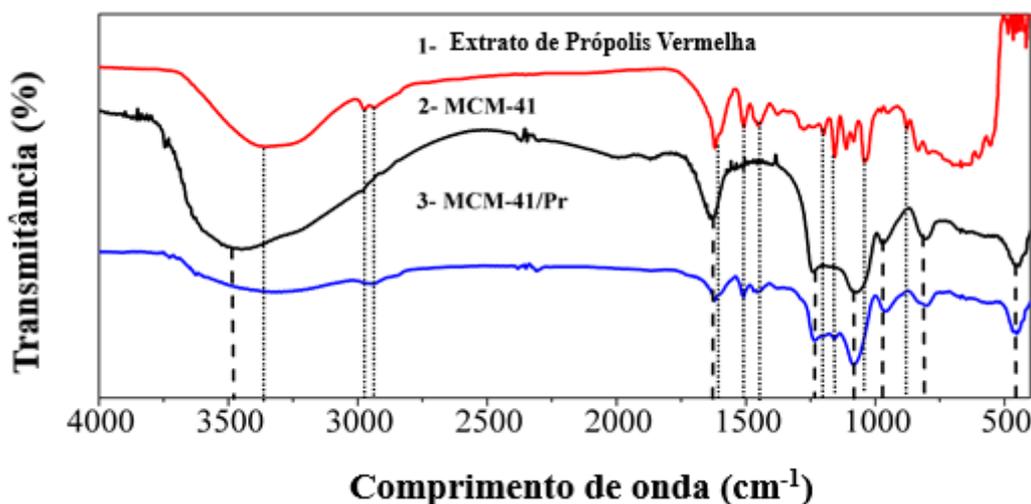
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos visando investigar os grupos funcionais e ligações químicas presentes nas amostras. A espectroscopia de FTIR é uma das técnicas utilizadas nas áreas da química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas e também, bastante aplicada na caracterização de nanopartículas, com a finalidade de poder determinar a forma da associação entre a amostra e a nanopartícula (SCHAFFAZICK et al, 2003; LOPES; FASCIO, 2004).

Portanto, utilizou-se a técnica de espectroscopia FTIR com pastilha de KBr para analisar a nanopartícula MCM-41 e o extrato de própolis vermelha, bem como investigar a interação entre os dois. A Figura 27 mostra os espectros de FTIR do extrato de própolis vermelha, MCM-41 e MCM-41/Pr.

Figura 27. FTIR do (1) Extrato de própolis vermelha, (2) MCM-41 e (3) MCM-41/Pr.



Fonte: Autor (2019).

O espectro 1 da Figura 27 refere-se a espectroscopia de FTIR do extrato própolis vermelha, no qual pode ser observada uma banda larga de absorção na região de 3336 cm^{-1} característica de vibração molecular, referente à deformação axial do grupo hidroxila ($-\text{OH}$) típico em compostos fenólicos, substâncias majoritárias na própolis.

As bandas de absorção a 2970 cm^{-1} e 2932 cm^{-1} correspondem a deformação axial do grupo CH_3 . As que ocorrem nos comprimentos de onda de 1617 cm^{-1} , 1496 cm^{-1} e 1450 cm^{-1}

são provenientes do alongamento do grupo C = C dos anéis aromáticos. Nos comprimentos de onda de 1160 cm⁻¹ e 1200 cm⁻¹ as bandas correspondem à vibração do grupo C – O de fenóis.

A presença de uma banda intensa na região de 1045 cm⁻¹ está relacionada à vibração da deformação axial da ligação éter C – O, na região de 877 cm⁻¹ pode ser atribuída à deformação angular fora do plano de compostos aromáticos C – H.

A presença de compostos aromáticos numa amostra é verificada pela existência de bandas na região de baixa frequência entre 900 e 675 cm⁻¹ (AZEVEDO, SILVA et al., 2018).

A relação entre os valores das bandas de absorção e os grupos químicos encontrados no material da MCM-41 e no extrato de própolis vermelha estão sintetizados na Tabela 5. Diante do exposto, pode-se verificar que o extrato de própolis utilizado possui a presença de compostos aromáticos característicos de fenóis, flavonoides e isoflavonoides.

Tabela 5. Tabela da relação entre os valores das bandas de absorção e os grupos químicos encontrados na MCM-41 e no extrato de própolis vermelha.

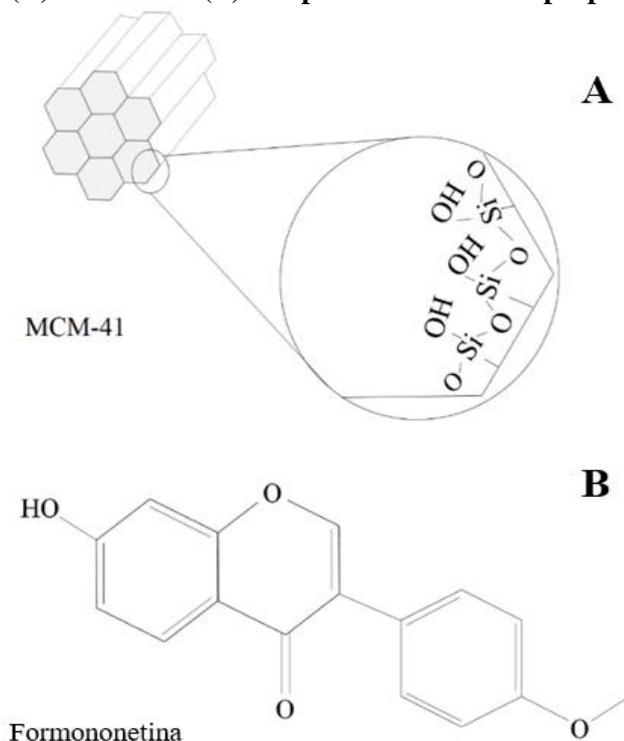
Bandas (cm⁻¹)	Grupos químicos	Material
3200 – 3700	–OH	MCM-41
1625	H – OH	H ₂ O
1240	Si – O – Si	MCM-41
1076		
953	Si – O – Si	MCM-41
812	Si – OH	MCM-41
450	O – Si – O	MCM-41
3336	–OH	Extrato de Própolis Vermelha
2970	C-H aromáticos	Extrato de Própolis Vermelha
2932	CH ₃	Extrato de Própolis Vermelha
1617	C=C aromáticos	Extrato de Própolis Vermelha
1496		
1450		

1045	C-O (álcoois primários, de éter alifático e Cíclico)	Extrato de Própolis Vermelha
877 831	C-H (deformação angular fora do plano, de aromáticos polinucleares)	Extrato de Própolis Vermelha

Fonte: Autor (2020).

A espectroscopia de FTIR da MCM-41 no espectro 2 (Figura 27) e da MCM-41/Pr no espectro 3 (Figura 27) mostram em ambos as bandas relacionadas ao comportamento vibracional de silanois. A banda larga na região do comprimento de onda entre 3200 a 3700 cm^{-1} está associada à vibração das ligações dos grupos hidroxílicos –OH dos grupos silanois presentes na estrutura molecular do MCM-41 [Figura 28 (A)].

Figura 28. Estrutura da (A) MCM-41 e (B) compostos fenólicos da própolis vermelha.



Fonte: Autor (2019).

A banda expressada no comprimento de onda de 1625 cm^{-1} pode ser atribuída a vibrações angulares de moléculas de água adsorvidas nas estruturas da MCM-41 (Figura 27 espectro 2). As regiões de 1240 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} são características do estiramento assimétrico

do grupo Si – O – Si. A banda em 953 cm^{-1} está relacionada ao alongamento simétrico do grupo Si – O – Si. Em 812 cm^{-1} a banda corresponde ao estiramento do grupo silanol Si – OH e no comprimento de onda de 450 cm^{-1} a banda é característica das vibrações do grupo O – Si – O (HUANG, MA et al., 2018).

No espectro 3 da Figura 27 pode ser observada a espectroscopia de FTIR da MCM-41/Pr, em que se observa uma redução significativa na intensidade da banda na região de 3450 cm^{-1} , provavelmente devido à interação das ligações de hidrogênio entre as hidroxilas presentes na estrutura mesoporosa de sílica [Figura 28 (A)] e das hidroxilas presentes nos compostos fenólicos do metabólitos secundários do extrato de própolis [Figura 28 (B)]. Além disso, pode-se observar a presença de bandas de absorção características dos compostos fenólicos nas regiões de 2970 cm^{-1} e 2932 cm^{-1} , 1627 cm^{-1} , 1508 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} e 1157 cm^{-1} .

Além da interação entre as hidroxilas, pode ter ocorrido uma interação entre o C – O dos grupos fenólicos, devido à redução significativa das bandas correspondentes à vibração desse grupamento. Outra possível interação pode ter ocorrido através dos grupamentos éter C – O, pois a expressão da banda no comprimento de onda de 1045 cm^{-1} não foi observada após a incorporação. Assim como pode ter ocorrido uma interação através dos anéis aromáticos, uma vez que a banda correspondente a deformação angular do grupo C – H do anel aromático não aparece no espectro 3 (Figura 27). Popova et al. (2018), relataram que pode ser considerada, segundo as características espectrais, que a interação entre o extrato de própolis da Bulgária e as nanoestruturas de sílica, SBA-15 e MCM-41, funcionalizadas com nanopartículas de prata ocorreram positivamente, através do grupamento carbonila e do anel aromático.

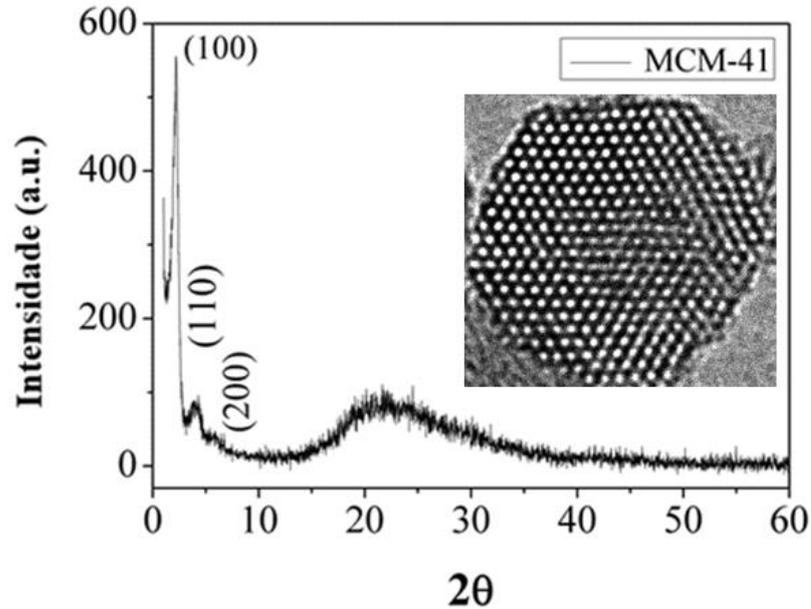
Desta forma, pode ser observado que ocorreu a interação entre o extrato etanólico da própolis vermelha e a estrutura da nanopartícula de sílica mesoporosa, conservando as características físico-químicas das mesmas.

5.2 Difração de Raio-X de Baixo Ângulo (DRX)

A difração de raio-X de baixo ângulo da MCM-41 (Figura 29) mostra a ausência de picos em ângulos mais altos entre 15° a 60° , pois a parede estrutural do MCM-41 é formada de sílica amorfa. Entretanto, pode-se observar um forte pico em (100) a $2\theta = 2,28^\circ$ e dois picos mais fracos em (110) e (200) a $2\theta = 4,15^\circ$ e $2\theta = 5,77^\circ$, respectivamente, que representam a estrutura hexagonal p6mm de maneira ordenada, onde um poro é cercado por outros seis poros [Figura 28 (A)] (DOS SANTOS, PEREIRA et al., 2020; SALVIANO, 2017). Assim, pode ser observado que o arranjo dos átomos desse material não apresenta alta cristalinidade, sendo o

único elemento com ordem estrutural a disposição periódica dos canais (SALVIANO, 2017), que nesse caso são bidistribuídos, como mostrado no resultado da Seção 5.4.

Figura 29. Difração de Raio-X da MCM-41.



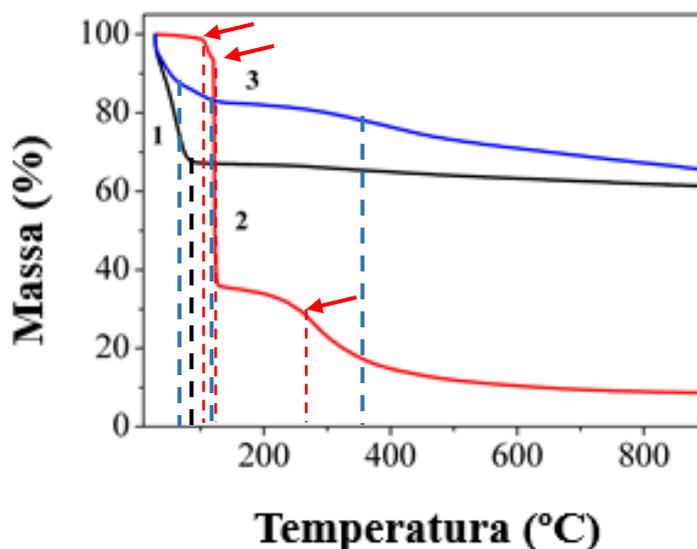
Fonte: Autor (2021).

Sun et al. (2017), avaliaram a estrutura da MCM-41 sintetizada e carregadas com α -tocoferol e observaram as mesmas características por difração de raio X em ângulo baixo para a MCM-41 livre exibindo os picos bem definidos em (100), (110), (200) e (210), observando também que após a interação com o α -tocoferol a intensidade dos picos reduziu, indicando a adsorção do bioativo na estrutura mesoporosa da sílica.

5.3 Análise Termogravimétrica (TG)

Após 5,0 mg de cada amostra serem submetidas a uma rampa de aquecimento no fluxo de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e em fluxo de ar nitrogênio a $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a resposta da perda de massa para cada amostra pode ser observada na Figura 30.

Figura 30. Termograma da (1) MCM-41, (2) EPV e (3) MCM-41/Pr.



Fonte: Autor (2019).

Na decomposição térmica da MCM-41, mostrada na Figura 30 curva 1, pode ser observada a perda de massa em apenas um ponto na faixa de temperatura entre 80°C a 100°C (----), que correspondente à perda de aproximadamente 32,64% de água adsorvida nos poros da nanopartícula de sílica em uma reação endotérmica (WOLIŃSKA-GRABCZYK, WÓJTOWICZ et al., 2018).

A curva termogravimétrica do extrato de própolis vermelha (Figura 30 curva 2) mostra três pontos de decaimento de massa (---- e ←): i) o primeiro ponto de decaimento entre 100°C - 120°C devido à desidratação; ii) o segundo decaimento entre 120 – 135 referente ao processo de fusão dos compostos orgânicos de baixo peso molecular como os flavonoides, isoflavonoides e outros compostos fenólicos; iii) um terceiro ponto entre 220 - 450°C é atribuído à descarboxilação do material orgânico restante (AZEVEDO, SILVA et al., 2018).

O sistema nanoparticulado MCM-41/Pr (Figura 30 curva 3) apresenta três etapas consecutivas de decaimento da massa total (----). O primeiro evento de decaimento, em torno de 80°C, equivale a 13,56% referente à porção de água presente na nanoestrutura, na faixa de temperatura de 120°C a 550°C ocorre o segundo e o terceiro eventos de decaimento correspondentes à decomposição dos metabólitos secundários presentes no extrato da própolis vermelha, sendo observado o mesmo perfil de decaimento no termograma em vermelho (Figura 30 curva 2). A perda de massa nessa faixa de temperatura (120°C – 550°C) é correspondente a 14,56%, que pode ser considerada a massa de própolis encapsulada na nanoestrutura da MCM-

41 uma vez que a estrutura da sílica mesoporosa não perde massa em temperaturas acima de 100-120°C.

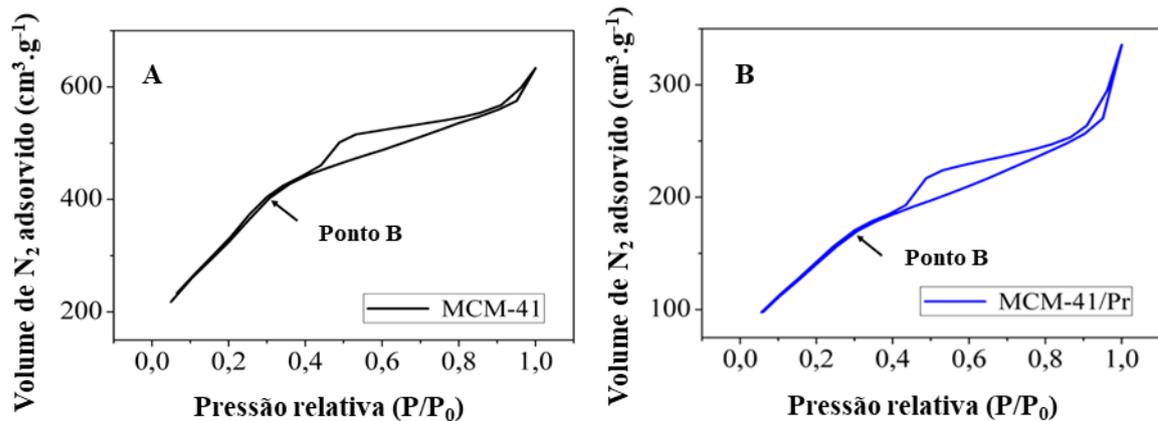
Pode-se observar ainda que após a encapsulação a temperatura necessária para deterioração dos metabólitos secundários da própolis vermelha é um pouco mais alta no terceiro evento de decaimento de massa, onde para a EPV livre o terceiro decaimento foi registrado na faixa de temperatura de 220°C a 450°C e para a MCM-41/Pr o evento ocorre entre as temperaturas de 330°C a 500°C.

Analisando os três termogramas de TG pode ser notado que a estrutura mesoporosa de sílica influencia na estabilidade do EPV por promover proteção térmica para o mesmo melhorando sua estabilidade físico-química, deslocando para maiores temperaturas a perda de massa total.

5.4 Isotermas de Adsorção-Dessorção de Nitrogênio

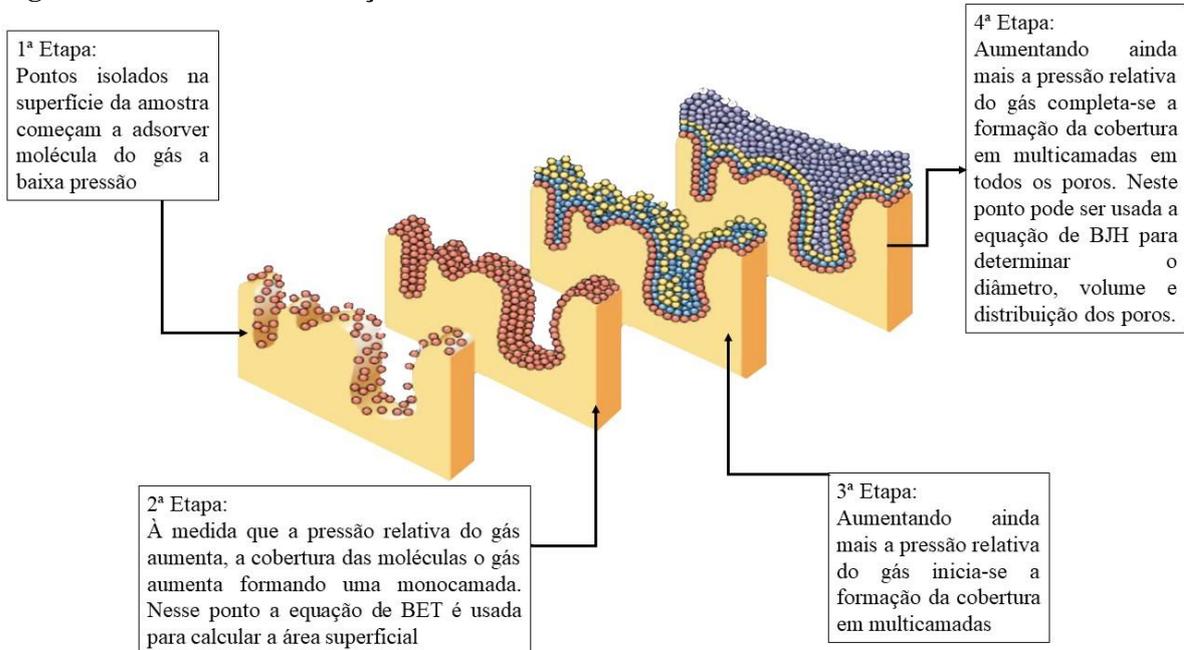
A Figura 31 mostra as isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio das amostras MCM-41 e MCM-41/Pr. Ambas as isotermas apresentadas são do tipo IV, características de materiais mesoporosos. Essas isotermas, apresentam dois ciclos em que o primeiro, referente ao processo de adsorção, inicia com uma inflexão decorrente da formação da monocamada do adsorvato na superfície do sólido, neste caso da MCM-41, na qual se forma por completo no ponto B (Figura 31), seguindo, com o aumento da pressão relativa do gás, para a formação da multicamada e, então, quando a pressão relativa é mais alta ocorre a condensação capilar, fenômeno em que o gás condensa em uma fase semelhante a um líquido promovendo o enchimento dos poros por completo, nesse ponto a adsorção cessa (Figura 32) e inicia-se o processo de dessorção, representada no segundo ciclo (NADERI, 2015; THOMMES, KANEKO et al., 2015).

Figura 31. Isotermas de adsorção-dessorção de nitrogênio de (A) MCM-41 e (B) MCM-41/Pr.



Fonte: Autor (2019).

Figura 32. Processo de adsorção.



Fonte: Adaptado de Matshitse (2017).

Além disso, as isotermas apresentaram curva de histerese, que se localizam na faixa de pressão em que ocorre a formação de multicamadas na fisiossorção, geralmente, associadas à condensação capilar e podem ser atribuídas à metaestabilidade da adsorção ou ao efeito de rede de poros largos e aberturas estreitas, em que, para permitir que ocorra a dessorção, é preciso reduzir um pouco mais a pressão relativa do gás adsorvido (THOMMES, KANEKO et al., 2015). As isotermas da Figura 31 apresentam histerese do tipo H4, que corresponde a materiais com microporos e mesoporos, evidenciando dessa forma uma estrutura bidispersa (THOMMES, KANEKO et al., 2015; TZANKOV, TZANKOVA et al., 2019).

Os resultados calculados a partir das curvas isotérmicas de adsorção/dessorção pelas equações de BET e de BJH estão apresentados na Tabela 6, onde a amostra MCM-41 apresentou alta área superficial e após a incorporação do extrato de própolis vermelha a área foi reduzida em 57,42%. Para a amostra MCM-41 o volume de poro observado foi de 0,450 cm³.g⁻¹ e após a incorporação da própolis ocorreu uma redução equivalente a aproximadamente 28,89%. Esses fatos podem ser atribuídos à incorporação de própolis nos poros das partículas mesoporosas. Ambas as curvas tinham um diâmetro médio de poros equivalentes.

Tabela 6. Dados estruturais da MCM-41 e MCM-41/Pr (S_{BET} , superfície específica; V_t , volume total poro).

Amostra	S_{BET} (m ² .g ⁻¹)	Tamanho do poro BJH (nm)	V_t (cm ³ .g ⁻¹)
MCM-41	1289,971	3,638	0,450
MCM-41/Pr	549,228	3,606	0,320

Fonte: Autor (2019).

As MCM-41 sintetizadas por Gan et al. (2015) apresentaram isotermas do tipo IV com área superficial de 960,7 m².g⁻¹, volume de poro de 0,98 cm³.g⁻¹ e tamanho dos poros de 2,7 nm. A histerese da isoterma deste trabalho também pode ser classificada como do tipo H4. Dessa forma pode ser observado que a metodologia foi facilmente reproduzida e as pequenas alterações no processo de síntese favoreceram o aumento da área superficial, bem como o aumento do tamanho dos poros, que provavelmente favoreceram o processo de sorção do extrato da própolis vermelha. Avaliando outro estudo realizado com MCM-41 modificada com nanopartículas de prata, as quais também foram utilizadas para carrear a própolis, pode ser observado que a isoterma de Ag-MCM-41 apresentou o mesmo perfil sendo do tipo IV com histerese do tipo H4, a área superficial obtida foi de 927 m².g⁻¹, quando a mesma foi carregada com a própolis sua área superficial caiu para 301 m².g⁻¹, tendo uma redução de aproximadamente 67,5% (POPOVA, LAZAROVA et al., 2018).

Possivelmente a maior eficiência de encapsulação da própolis da Bulgária se deu pela metodologia aplicada no processo de incorporação sendo realizada por incubação a 37°C em um sistema com álcool 70% e 1:1 (m/m) de própolis:MCM-41 durante 24 horas. Já a incorporação realizada no presente trabalho foi desenvolvida durante 24 horas a 37°C sob agitação magnética de aproximadamente 100 rpm, que pode ter favorecido o processo de sorção como também à dessorção reduzindo a eficiência de encapsulação. Com relação aos tamanhos de poro da MCM-41, sintetizada por Popova et al. (2018) os autores obtiveram 2,6 nm e após a incorporação da própolis o tamanho de 2,4 nm. Pode-se observar o que os tamanhos dos poros

de ambos os estudos foram mantidos em valores muito próximos, que pode ser atribuído a interação da própolis com o grupamento OH da superfície da MCM-41 formando uma monocamada, mantendo o diâmetro do poro quase do mesmo tamanho que antes da incorporação.

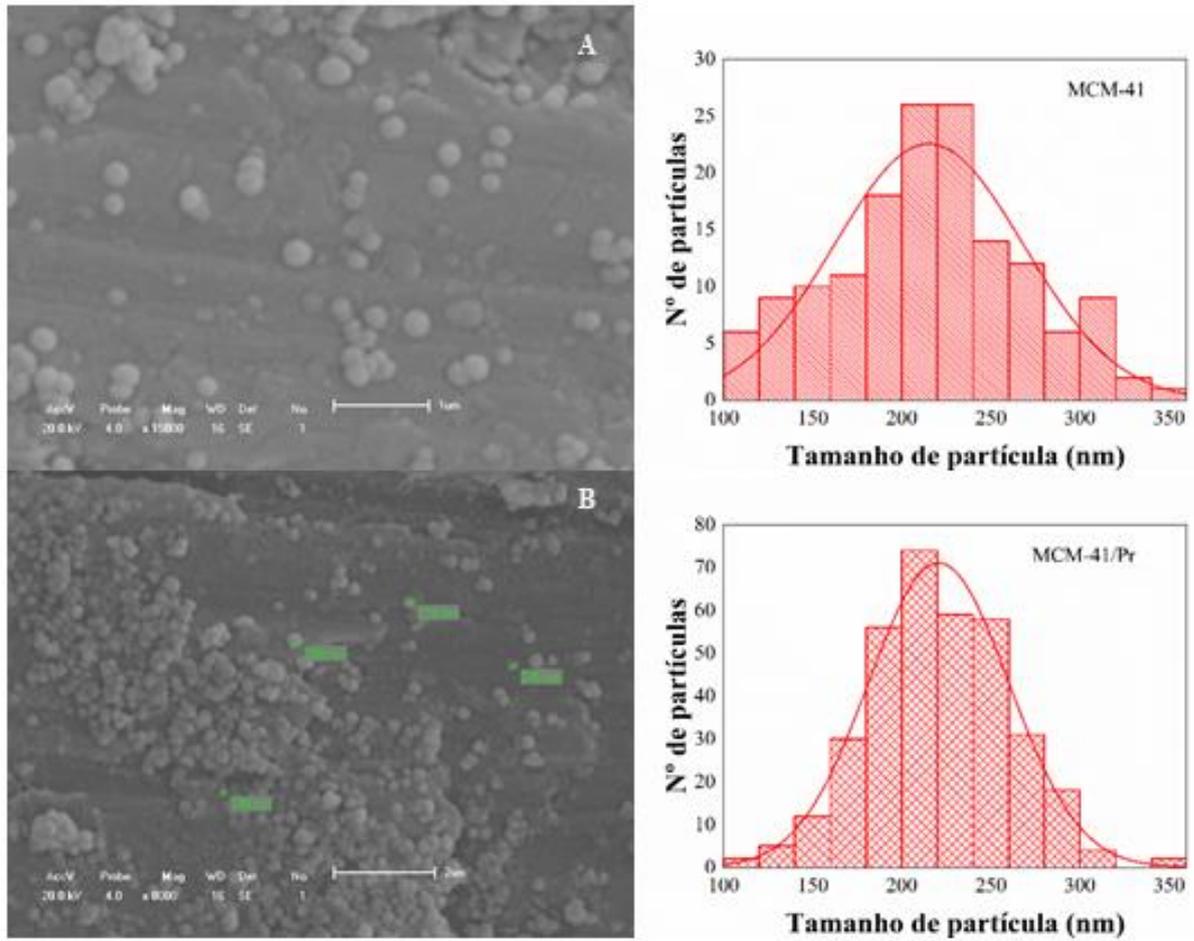
5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As imagens de MEV fornecem as micrografias com objetivo de observar a estrutura topográfica do material. A Figura 33 mostra as micrografias MEV da MCM-41 obtidas com uma ampliação de 15000x (escala 1 μm) [Figura 33 (A)] e MCM-41/Pr [Figura 33 (B)] obtidas com uma ampliação de 8000x (escala 2 μm). Nelas podem ser vistas que as partículas estão com estrutura morfológica esférica, em algumas partículas na micrografia da MCM-41 pode ser visto o formato hexagonal típico das MSNs [Figura 33 (A)].

Os histogramas de distribuição de tamanho médio de partícula foram obtidos determinando-se o tamanho de 100 partículas da MCM-41 e 350 partículas para MCM-41/Pr (Figura 33). Pode-se observar que a maior parte das partículas apresenta tamanhos entre 100 e 300 nm, sendo 210 nm o tamanho de partícula predominante, mesmo após a incorporação da própolis vermelha nas MCM-41 de aproximadamente 15% (p/p), o que sugere que o EPV ao interagir com a MCM-41 ficou retido na parte interna dos mesoporos, adicionalmente, uma pequena porção estar na parte externa de forma superficial alternando a coloração da amostra (Figura 34) , mas não afetando o tamanho das partículas.

Também foi possível observar que as partículas tendem a se unir para formar uma estrutura aglomerada que afeta a distribuição uniforme do tamanho final. Este evento pode estar acontecendo devido à baixa carga superficial, que pode ser corrigida através de funcionalização, aumentando a carga superficial e, conseqüentemente, aumentando a repulsão eletrostática e evitando a formação de aglomerados (SILVA FILHO, 2016).

Figura 33. MEV da (A) MCM-41 e (B) MCM-41/Pr e seus respectivos histogramas de distribuição de tamanho de partícula.



Fonte: Autor (2019).

Figura 34. Amostras de MCM-41 e MCM-41/Pr.



Fonte: Autor (2021).

Com relação a variação dos tamanhos das partículas este comportamento pode estar ocorrendo devido à dificuldade de se controlar, em uma solução coloidal, a taxa de nucleação, que é a formação de centro de cristalização, e a taxa do crescimento do cristal em volta deste centro formado inicialmente. Para se obter uma alta dispersão é importante manter a taxa de nucleação alta e a taxa de crescimento baixa (SHAW, 1992).

5.6 Cromatografia Líquida de Ultraeficiência (UPLC-DAD)

Segundo Dausch et al. (2008), através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (HPLC-RP) foi possível realizar a detecção de flavonoides e outros constituintes da própolis. Dessa forma, foi feito o perfil cromatográfico da própolis vermelha proveniente do Estados de Alagoas e dentre os flavonoides e isoflavonoides identificados estão: liquiritigenina, isoliquiritigenina, formononetina, daidzeína, quercetina, rutina, pinocembrina, dalbergina e biochanina A, sendo, os três primeiros encontrados em maiores concentrações e os demais constituintes apresentam-se em concentrações mais baixas.

Dessa maneira, os resultados da identificação de flavonoides e isoflavonoides realizados neste trabalho pela técnica cromatográfica de UPLC-DAD estão em concordância com os dados obtidos na literatura (DOS SANTOS, MUNARI et al., 2019; DO NASCIMENTO, ARRUDA et al., 2019).

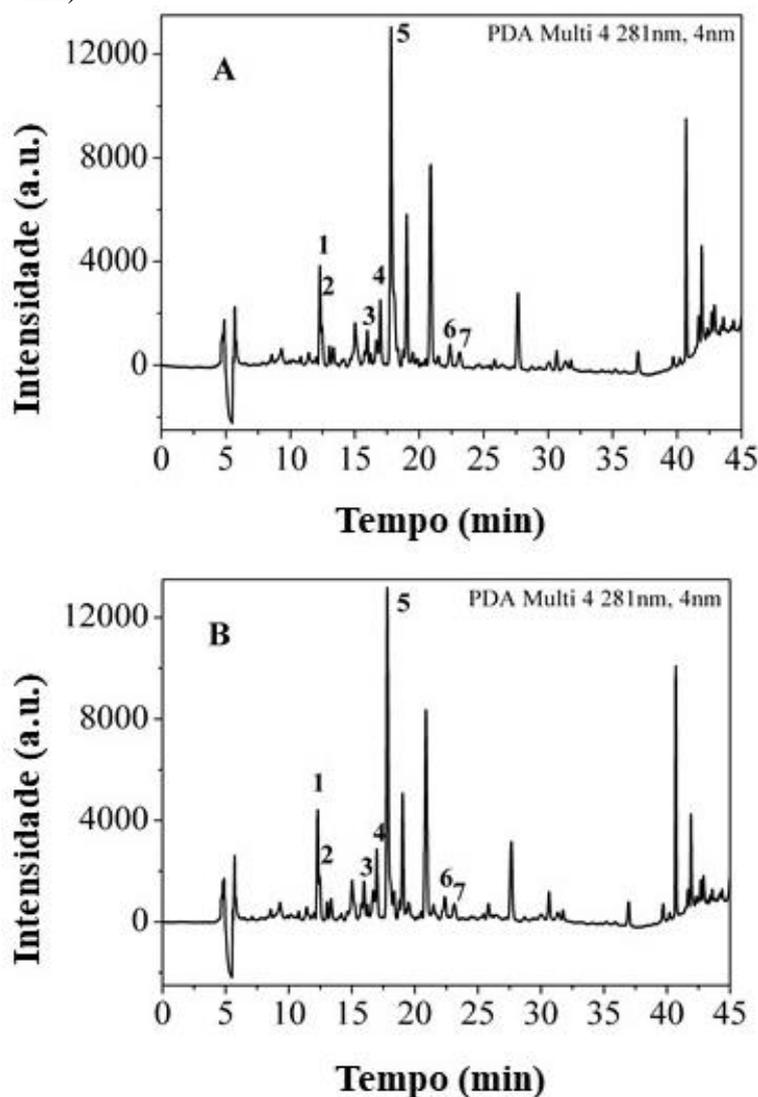
Na Figura 35 podem ser observados os cromatogramas do extrato de própolis vermelha [Figura 35 (A)] e da MCM-41/Pr [Figura 35 (B)], os quais apresentaram boa resolução dos picos cromatográficos indicando a presença de flavonoides e isoflavonoides entre o tempo de retenção de 12,29 min característico da liquiritigenina e o tempo de retenção de 23,18 min da biochanina A. A ordem de eluição segue o modelo de maior polaridade para o de menor polaridade na seguinte ordem de tempo de retenção (Rt): (1) liquiritigenina (12,29 min), (2) daidzeína (12,46 min), (3) pinobanksina (15,96 min), (4) isoliquiritigenina (16,97 min), (5) formononetina (17,87 min), (6) pinocembrina (22,37 min) e (7) biochanina A (23,18 min). Os picos que aparecem anteriores aos dos biomarcadores da própolis são característicos dos solventes utilizados para a preparação da amostra para análise (DO NASCIMENTO, SILVA et al., 2016).

Observando-se os tempos de retenção dos picos cromatográficos do cromatograma do EPV e da MCM-41/Pr, cuja análise foi realizada através do mesmo método analítico, pode-se afirmar que o extrato de própolis vermelha está presente no sistema mesoporoso da MCM-41. Desta forma, a incorporação ocorreu de maneira efetiva, conservando as propriedades bioativas

do produto natural. Em ambos os cromatogramas pode-se perceber área de detecção dos biomarcadores da própolis vermelha com ordem de eluição de maior polaridade para o de menor polaridade Figura 35.

Figura 35. Perfil cromatográfico da própolis vermelha usando UPLC-DAD para (A) Extrato de própolis vermelha e (B) MCM-41/Pr.

(1) liquiritigenina (12,29 min), (2) daidzeína (12,46 min), (3) pinobanksina (15,96 min), (4) isoliquiritigenina (16,97 min), (5) formononetina (17,87 min), (6) pinocembrina (22,37 min) e (7) biochanina A (23,18 min).



Fonte: Autor (2019).

Para melhor visualizar a correlação da quantidade dos flavonoides e isoflavonoides detectados no EPV e na MCM-41/Pr a Tabela 7 mostra a concentração dos sete biomarcadores majoritários. No extrato de própolis vermelha, a concentração de formononetina e liquiritigenina foram, $9,92 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $6,51 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Para formononetina e

liquiritigenina, respectivamente. As concentrações de formononetina e liquiritigenina na MCM-41/Pr, foram 11,44 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 7,41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 7. Determinação dos biomarcadores presentes na Própolis Vermelha e na MCM-41/Pr.

	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	
	Própolis Vermelha	MCM-41/Pr
Daidzeína	2,941	3,329
Liquiritigenina	6,508	7,411
Isoliquiritigenina	5,798	6,117
Formononetina	9,923	11,438
Biochanina A	0,736	0,749
Pinobanksina	1,586	1,592
Pinocebrina	0,872	0,985

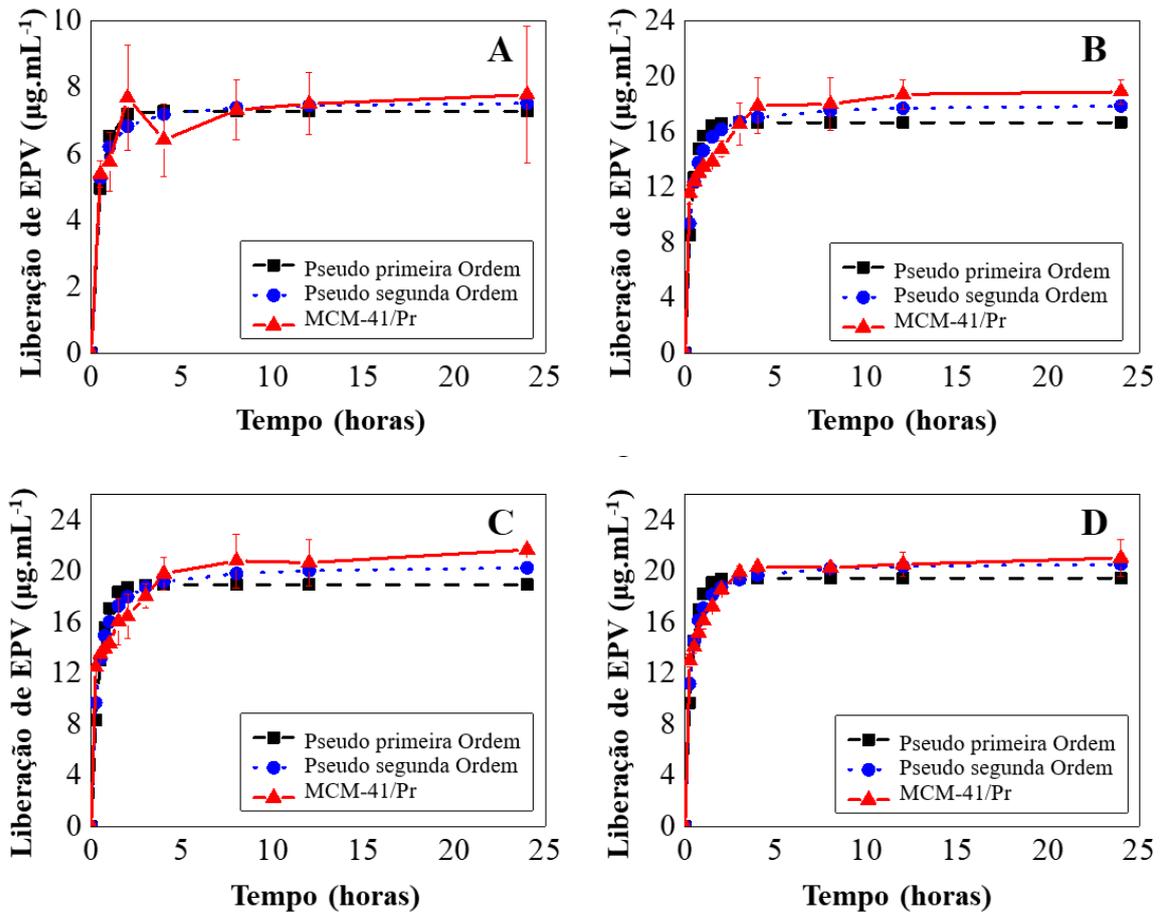
Fonte: Autor (2019).

Silva (2015) realizou o estudo dos biomarcadores do extrato etanólico da própolis vermelha nas concentrações de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ encontrando para esta as concentrações nos valores de 2,29, 0,20, 2,51, 2,96 e 0,371 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os biomarcadores liquiritigenina, pinobanksina, isoliquiritigenina, formononetina e biochanina A, respectivamente. A diferença entre os valores encontrados pode estar ligada a influência sazonal que a própolis pode sofrer no decorrer do ano (PARK, PAREDES-GUZMAN et al., 2004). No mesmo estudo, foi realizada a encapsulação do EPV em nanopartículas poliméricas, nas quais a concentração desses cinco biomarcadores, foi um pouco mais baixa, no entanto, a eficiência de encapsulação, por exemplo, do biomarcador de maior concentração no EPV (formononetina) foi em torno de 58 a 82% nas diferentes formulações produzidas, e para o biomarcador biochanina A variou entre 88 a 99%. Isto mostra que sistemas nanoparticulados podem ser aplicáveis para biodisponibilização da própolis uma vez que suas propriedades físico-químicas são mantidas e até protegidas.

5.7 Ensaio de Dissolução MCM-41/Pr

O perfil de liberação *in vitro* da própolis vermelha encapsulada na MCM-41 pode ser visto na Figura 36. Os ensaios de dissolução foram realizados em condições ligeiramente alcalinas e ácidas. Em pH 5,5, aproximadamente $5,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que corresponde a ~11% do extrato de própolis vermelha foi liberado no meio nas primeiras horas, atingido $7,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (15%) após 24 horas. Para todas as condições de pH alcalino estudadas, a porcentagem inicial de liberação do extrato de própolis vermelha foi em torno de 25%, equivalente a cerca de $13 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Observando os meios de dissolução com pH de 7,4 e 7,6, a quantidade de própolis vermelha no meio de dissolução após 4 horas foi de aproximadamente $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$, equivalente a 40% de bioativo disponível no sistema carreador. Nestes dois meios de dissolução pode ainda ser observado que após as 4 horas a concentração manteve quase a mesma chegando a atingir até no máximo cerca de $21 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (correspondente a 42%) após 24 horas de dissolução. No meio de dissolução de pH igual a 7,2, a liberação foi em torno de $17 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (35%) após 4 horas do início do ensaio, também chegando quase no platô neste ponto, sendo observado que após as 24 horas, a concentração atingida foi em torno de $18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (37%).

Figura 36. Perfil de liberação *in vitro* dos flavonoides da própolis vermelha da MCM-41 no pH de (A) 5,5, (B) 7,2, (C) 7,4 e (D) 7,6.



Fonte: Autor (2020).

Para um melhor entendimento do mecanismo de liberação do extrato de própolis das partículas de sílica mesoporosas, os dados experimentais foram ajustados a dois modelos matemáticos: pseudo primeira ordem e pseudo segunda ordem. Considerando os dados da Tabela 8, nota-se que os modelos cinéticos de pseudo primeira e pseudo segunda ordem obtiveram bons ajustes para todos os pH's estudados, uma vez que o coeficiente de determinação (R^2) ficou acima ou igual a 0,86.

Tabela 8. Cinética de liberação *in vitro* da própolis vermelha encapsulada na MCM-41.

Amostra	Pseudo primeira Ordem				Pseudo segunda Ordem			
		$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t})$			$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$			
pH	R^2	ARE (%)	q_e ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	k_1 (1 h^{-1})	R^2	ARE (%)	q_e ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	k_2 ($\text{mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
MCM-41/Pr	5,5	0,9554	6,45	7,28	2,2855	0,9649	5,51	0,5951
	7,2	0,8659	11,54	16,67	2,8657	0,9488	6,88	18,03
	7,4	0,8626	12,34	18,93	2,3284	0,9475	7,51	20,49
	7,6	0,9263	8,45	19,43	2,7549	0,9806	4,15	20,72

Fonte: Autor (2020).

Observando-se a resposta apenas para o modelo de pseudo primeira ordem, percebe-se que é difícil representar a taxa de dissolução atenuada que ocorre em pH de 5,5, 7,2 e 7,4 entre 0 e 5 horas, estabelecendo uma concordância de tendência somente após este período. Porém, à medida que o pH aumenta, a taxa de dissolução inicial aumenta, levando a uma melhor convergência nesta região. Porém, é em pH 5,5 que ocorre o melhor ajuste, com R^2 de 0,9554 e ARE = 6,45%.

De acordo com as respostas do modelo de pseudo segunda ordem, observou-se que este apresentou um erro relativo médio mais baixo em relação ao ajuste em todos os pH do modelo de pseudo primeira ordem, conseguindo inclusive melhor representar a taxa de dissolução atenuada entre 0 e 5 horas. Além disso, este modelo foi o que melhor se aproximou do valor de dissolução de equilíbrio experimental, com erro relativo médio para este ponto de 4,38% em todas as análises, enquanto a pseudo primeira ordem foi de 9,58%.

Segundo Oliveira et al. (2020), o modelo de pseudo primeira ordem sugere a presença de interações majoritariamente físicas, enquanto o pseudo segunda ordem indicaria uma maior contribuição das interações de caráter químico. Assim, pode-se inferir que as interações descritas no processo de dissolução teriam uma energia superior às interações elétricas, explicando a dificuldade de resposta ao modelo de pseudo primeira ordem para as primeiras horas do processo.

Além disso, observando-se que os ajustes mais coerentes considerando ambos os modelos, ocorreram para pH= de 7,6, pode-se confirmar que o pH ótimo do fenômeno de dissolução gira em torno deste valor, confirmando que a melhor biodisponibilidade da própolis ocorre em meios mais alcalinos, uma vez que os compostos fenólicos, presentes em maiores quantidades na própolis vermelha, são considerados ácidos fracos e possuem melhor solubilidade em pH mais básico, permitindo uma dissociação mais fácil da superfície da sílica.

5.8 Atividade Antioxidante do EPV e MCM-41/Pr pelo método DPPH

Os compostos bioativos do extrato de própolis apresentam atividade antioxidante (MARCUCCI, OLIVEIRA et al., 2020). Dessa forma, avaliou-se a atividade antioxidante do EPV e da MCM-41/Pr pela metodologia de redução do radical DPPH usando as concentrações entre 100 a 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ conforme mostrado na Tabela 9. Os percentuais de sequestro dos radicais livres das concentrações mais baixas (10, 5, 1 e 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) tanto do EPV na forma livre como do EPV carregado na nanopartícula de sílica mesoporosa apresentam diferenças significantes com valor de $p < 0,05$. Comparando-se a atividade entre a forma livre e a forma

carreada, pode-se observar que a própolis livre apresenta uma resposta um pouco maior. O mesmo comportamento pode ser observado para concentrações maiores ou iguais a $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que apresentam diferenças extremamente significantes ($p < 0,001$) e respostas maiores para o EPV livre.

Tabela 9. Atividade antioxidante (%) do extrato da própolis vermelha e MCM-41/Pr.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (%)		
CONC. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Extrato de Própolis Vermelha	MCM-41/Pr
100	$93.26 \pm 2.17^{**}$	$91.82 \pm 0.95^{**}$
75	$92.68 \pm 0.18^{**}$	$87.53 \pm 0.17^{**}$
50	$92.00 \pm 0.15^{**}$	$85.38 \pm 0.23^{**}$
25	$81.92 \pm 0.93^{**}$	$71.37 \pm 1.74^{**}$
10	$48.26 \pm 1.38^*$	$38.60 \pm 1.48^*$
5	$28.97 \pm 1.54^*$	$23.18 \pm 0.91^*$
1	$8.66 \pm 0.58^*$	$6.27 \pm 2.00^*$
0,5	$3.35 \pm 2.58^*$	$3.30 \pm 0.45^*$

Diferença significativa entre as concentrações de extrato de própolis vermelha e MCM-41/Pr (100, 75, 50, 25, 10, 5, 1 e $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com $^{**}p$ -valor < 0.05 e *p -valor < 0.001 usando pós-teste de Bonferroni de two-way ANOVA.

Fonte: Autor (2019).

O método do DPPH é uma técnica adequada para atestar que os compostos fenólicos, mais especificamente os flavonoides e os isoflavonoides estão presentes no material estudado e que este possui capacidade de reduzir os radicais livres. A atividade antioxidante encontrada no extrato etanólico de própolis vermelha pode ser atribuída em maior parte pela presença do biomarcador isoliquiritigenina. Apesar também se encontrar formononetina em alta concentração no extrato, esta não contribuiu significativamente com o sequestro do radical livre em DPPH (SILVA, 2015).

Dessa forma, o sistema nanoparticulado de MCM-41 contendo a própolis vermelha apresentou atividade contra os radicais livres de DPPH e quando comparado ao EPV livre observa-se o mesmo comportamento de concentração dependente, onde quanto maior a concentração do extrato de própolis maior a atividade antioxidante. Na seção 5.6 mostra que o sistema nanoparticulado apresenta uma ótima eficiência de encapsulação do extrato de própolis, apresentando quantidade elevada de isoliquiritigenina e formononetina, que corrobora com os resultados da atividade antioxidante dessa amostra.

A CE_{50} (dose que elimina 50% dos radicais livres) do extrato de própolis vermelha na forma livre foi de $11,60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para o MCM-41/Pr foi de $14,59 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados mostraram que o MCM-41 tem potencial como transportador de flavonoides, isoflavonoides e

outros compostos presentes no extrato de própolis vermelha, pois mantém a integridade físico-química e dessa forma as suas propriedades farmacológicas.

Brezoiu et al. (2019) realizaram uma análise comparativa entre a atividade antioxidante do extrato de compostos fenólicos na forma livre e carregados em sistemas de MSNs de MCM-41 durante 6 meses. Observaram que após os 6 meses de armazenamento o extrato incorporado nos sistemas nanoparticulados apresentou atividade de sequestro dos radicais livres DPPH[•] significativamente maior que o extrato na forma livre com valor de $p < 0,05$. Os autores sugerem que as nanopartículas de sílica promovem proteção ao extrato evitando a degradação natural dos compostos fenólicos.

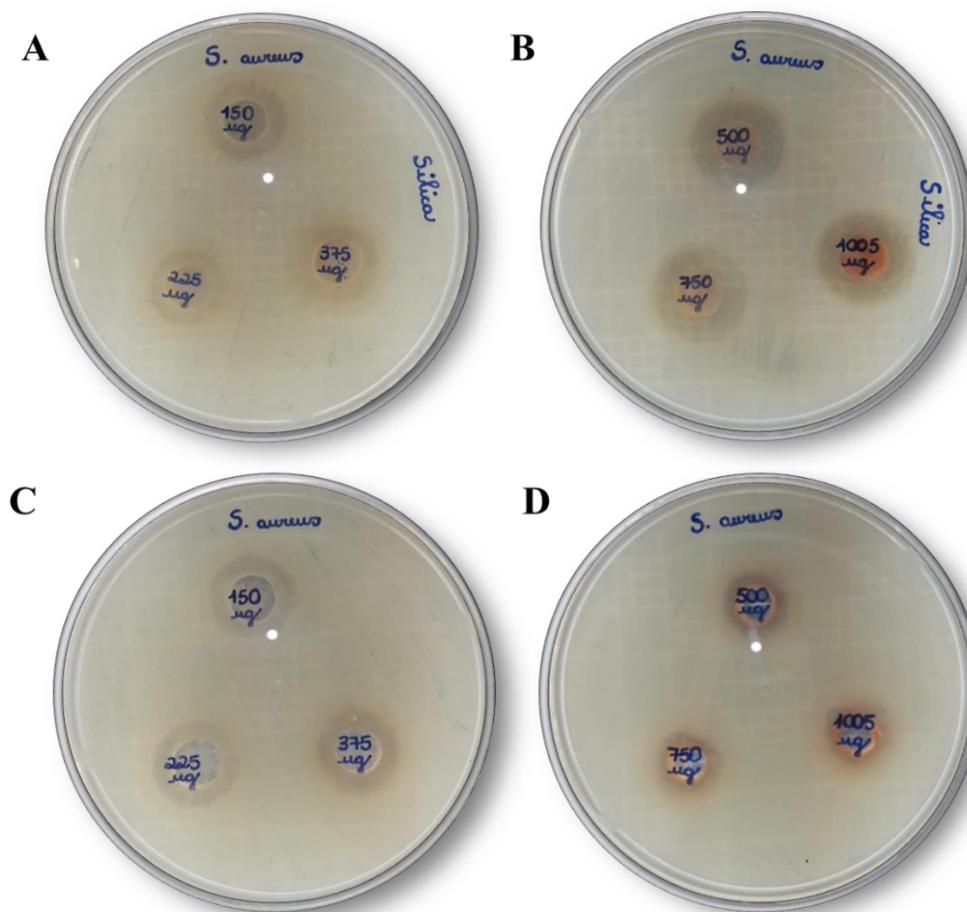
5.9 Atividade Antibacteriana de EPV e da MCM-41/Pr

Segundo Przybyłek e Karpiński (2019) a ação antimicrobiana da própolis deve ser atribuída ao sinergismo do potencial bactericida ou bacteriostático dos componentes presentes na sua composição química como pela potencialização do sistema imunológico, que ativa as defesas naturais do organismo. A ação antibacteriana analisada nesta seção é voltada para a capacidade direta dos metabólitos secundários presentes no extrato de própolis de causar danos ao microrganismo estudado inviabilizando-o.

O método de análise de difusão em poço é um método análogo ao ensaio de disco difusão, usado normalmente quando se trabalha com extratos de produtos naturais (BOYANOVA, GERGOVA et al., 2005).

Os resultados são expressos pela medição do diâmetro das zonas de inibição de crescimento do microrganismo ocasionadas pela ação do composto ativo estudado. Na Figura 37 podem ser observadas as zonas de inibição geradas pela amostra da MCM-41/Pr [Figura 37 (A, B)] e pelo extrato de própolis vermelha na forma livre [Figura 37 (C, D)] nas concentrações de 1050, 750, 500, 375, 225 e 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra a cepa bacteriana de *S. aureus* ATCC 25923.

Figura 37. Atividade antimicrobiana da (A e B) MCM-41/Pr e (C e D) extrato de própolis vermelha contra *S. aureus* (ATCC 25923) pelo método de poço difusão.

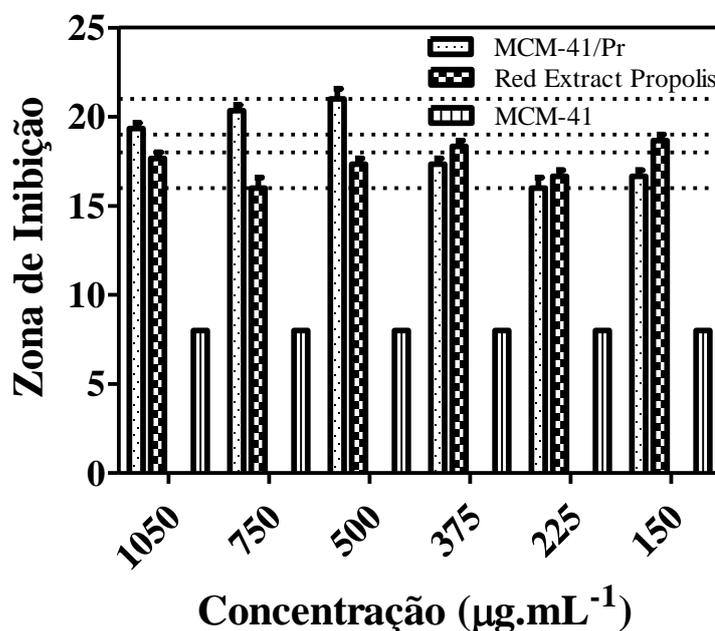


Fonte: Autor (2019).

Avaliando-se o resultado pode ser percebido que MCM-41 não mostrou zona de inibição ativa (≤ 8 mm) e que MCM-41/Pr e EPV apresentaram zonas de inibição com valores acima de 8 mm, valor que a amostra é considerada ativa contra bactérias e fungos (HENDI, NAHER e AL-CHARRAKH, 2011). Um estudo realizado com MCM-41 dotado com cobre (Cu-MCM-41), mostra que a MCM-41 na forma livre não apresenta atividade antibacteriana para *S. aureus* (BOUCHIKH, ADJDIR et al., 2020).

Os halos de inibição não apresentaram diferenças significativas com valor de $p < 0,05$ quando comparados os valores entre a zona de inibição da MCM-41/Pr e da EPV (Figura 38). Ambas as amostras apresentaram boa atividade antibacteriana, mostrando zona de inibição de entre 21 – 16 mm. Dessa forma, podemos observar que a interação do EPV com as nanopartículas de sílica não altera as propriedades biológica do extrato, corroborando com os resultados obtidos nos ensaios da atividade antioxidante.

Figura 38. Zona de inibição (mm) da MCM-41/Pr e do Extrato de própolis vermelha contra *S. aureus* (ATCC 25923) pelo método de poço difusão.



Diferenças não significantes entre a zona de inibição da MCM-41/Pr e o EPV ($p < 0,05$) usando teste de comparação por t teste não paramétrico.

Fonte: Autor (2020).

Um estudo realizado com extrato de própolis proveniente da região do Iraque nas concentrações de 10, 20 e 30% contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, realizada pelo método de difusão em poço, mostrou que o *S. aureus* foi extremamente sensível ao extrato a 10% com zona de inibição de 25 mm e em *Listeria monocytogenes* uma zona 18 mm. Já as zonas de inibição para bactérias Gram negativas foram abaixo de 14 mm. Para *Salmonella typhi* e *Klebsiella pneumoniae* o ensaio mostrou zona de inibição de 12 mm e para *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* e *Enterobacter aerugenes* apresentaram zona de inibição de 10 mm. As zonas de inibição são maiores quando aumenta a concentração do extrato de própolis, como exemplo, para o extrato na concentração de 20% e 30% as zonas de inibição para *S.aureus* foram de 28 e 30 mm, respectivamente (HENDI, NAHER e AL-CHARRAKH, 2011).

De acordo com a análise da atividade antibacteriana que determina a concentração inibitória mínima (CIM), a MCM-41/Pr e EPV inibiram as bactérias Gram-positivas e a bactéria Gram-negativa testada, sendo a CIM para o extrato após a encapsulação menor que o EPV na forma livre (Tabela 10), ou seja, a MCM-41/Pr apresenta potencial inibitório para as bactérias testadas maior que o EPV. Além disso, observa-se que as nanopartículas sem extrato não apresentaram atividade inibitória com as concentrações testadas.

Em todos os experimentos os controles positivos, do meio, do crescimento microbiano e dos solventes com e sem o inóculo foram adequados.

Tabela 10. Concentração inibitória mínima (CIM) da MCM-41, MCM-41/Pr e EPV.

Bactérias	MCM-41	MCM-41/Pr	EPV	Ciprofloxacino
Bactérias Gram-positivas				
<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	62,5 µg.mL ⁻¹	125 µg.mL ⁻¹	0,125 µg.mL ⁻¹
<i>Enterococcus faecalis</i>	NI	125 µg.mL ⁻¹	250 µg.mL ⁻¹	0,25 µg.mL ⁻¹
Bactéria Gram-negativa				
<i>Escherichia coli</i>	NI	250 µg.mL ⁻¹	500 µg.mL ⁻¹	0,0625 µg.mL ⁻¹

NI = Não Inibiu nas concentrações testadas

Fonte: Autor (2021).

Esses resultados corroboram com os observados pela técnica de difusão em poço contra a *S. aureus*, em que MCM-41 não formou zona de inibição e também não apresentou concentração inibitória mínima, ou seja, não possui atividade antibacteriana nas concentrações testadas. A MCM-41/Pr e EPV apresentaram inibição com ótima atividade antibacteriana. Além disso, pode-se observar que a CIM da MCM-41/Pr são menores para todas as bactérias testadas, apresentando maior potencial antimicrobiano quando comparada com o EPV. Possivelmente, o EPV quando nanoencapsulado apresenta melhor permeabilidade, aumentando o seu potencial terapêutico contra *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*. Sendo assim, pode ser considerado um carreador para o EPV no desenvolvimento de novas formas farmacêuticas de opoterápicos.

Um trabalho de pesquisa realizado para identificar compostos de extrato de própolis vermelha com potencial antibacteriano contra as bactérias *S. aureus* (CIP 483), *E. coli* (CIP 54127), *Bacillus subtilis* (CIP 5262) e *P. aeruginosa* (CIP 82118) (*Collection of Institute Pasteur* [CIP]) através da análise de microdiluição em caldo com tempo de incubação de 24 horas. O extrato bruto apresentou CIM para *S. aureus* de 125 µg.mL⁻¹, 1136 µg.mL⁻¹ contra a *B. subtilis* e 5000 µg.mL⁻¹ para as outras duas bactérias testadas. As frações hexânica do extrato da própolis vermelha testadas que apresentaram maior atividade contra *S. aureus* mostrou CIM de 62,50 µg.mL⁻¹. As frações hexânicas que tiveram melhor atividade contra *E. coli* apresentaram CIM de 1250 µg.mL⁻¹. Dessas frações que apresentaram melhores resultados foram preparadas subfrações, no qual a que mostrou melhor desempenho teve CIM de 56,75

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ (*S. aureus*), $454 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (*E. coli*), $28,37 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (*B. subtilis*) e $227 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (*P. aeruginosa*) (RUFATTO, LUCHTENBERG et al., 2018).

Tendo em vista a ótima eficiência de encapsulação da MCM-41/Pr observada na seção 5.6, o aumento do tempo de meia-vida do extrato quando este está nanoencapsulado, aumento na área de contato com o meio biológico e, assim, melhorando a permeabilidade e, possivelmente, a sua biodisponibilidade, a MCM-41 é uma proposta promissora para o desenvolvimento de medicamentos e/ou cosmeceuticos.

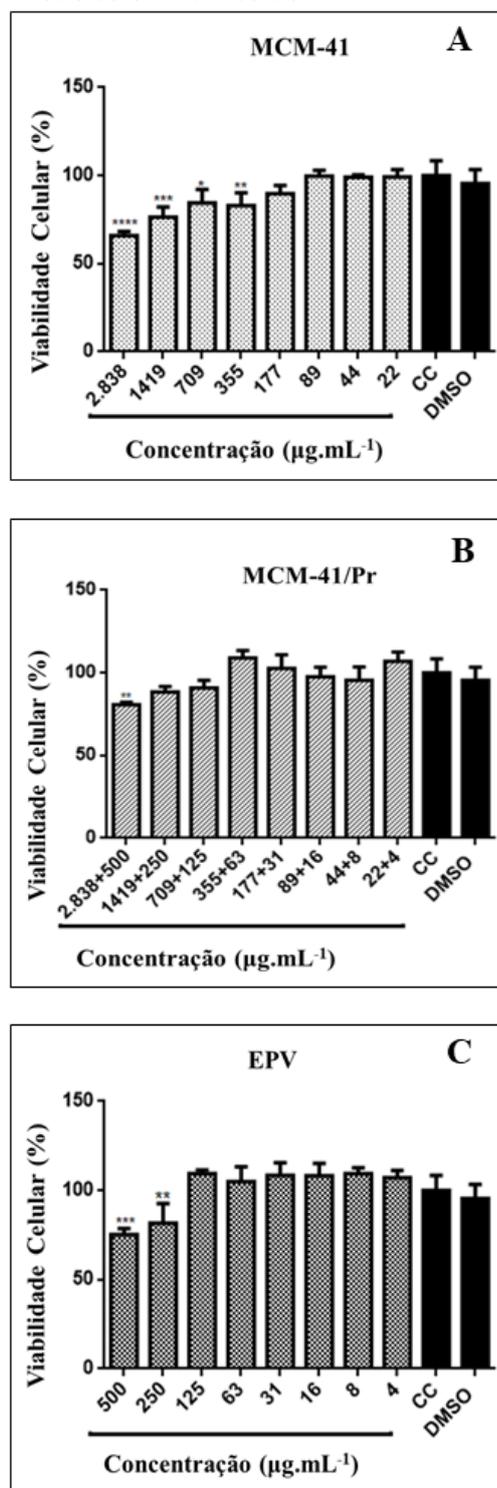
5.10 Viabilidade Celular

O ensaio de viabilidade celular é um teste que visa avaliar a biocompatibilidade dos materiais em estudo, ou seja, o quanto eles podem causar dano à célula que está sendo tratada experimentalmente, que consiste na capacidade citotóxica (DE OLIVEIRA, 2011).

Os resultados do teste de viabilidade celular, após 48 horas de tratamento com as amostras MCM-41, MCM-41/Pr e EPV mostraram que a sobrevivência das células Vero E6 diminuiu com o aumento da concentração, sendo dose dependente. Na Figura 39 pode ser observado que a concentração máxima não tóxica para a MCM-41 foi de $89 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para MCM-41/Pr foi de $418 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para o EPV $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

No entanto, a análise estatística mostrou que na concentração de $177 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de MCM-41 não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparada com o grupo controle. Com respeito a MCM-41/Pr e EPV nas mesmas concentrações citadas anteriormente, não houveram diferenças significativas com o grupo controle, sendo $p > 0,05$. A partir desses resultados, foi selecionada a maior concentração não tóxica da MCM-41/Pr para avaliação da atividade antiviral contra CHIKV.

Figura 39. Ensaio de citotoxicidade das nanopartículas contendo própolis vermelha em células Vero E6 por 72 horas pelo método colorimétrico do MTT.



Diferenças significativas entre MCM-41 e o grupo controle (CC), MCM-41/Pr e CC e o EPV e CC foram obtidas usando análise de variância *One-way* ANOVA e teste de Tukey de múltiplas comparações. (**** $p < 0,0001$).

Fonte: Autor (2021).

5.11 Atividade Antiviral Contra o Vírus Chikungunya

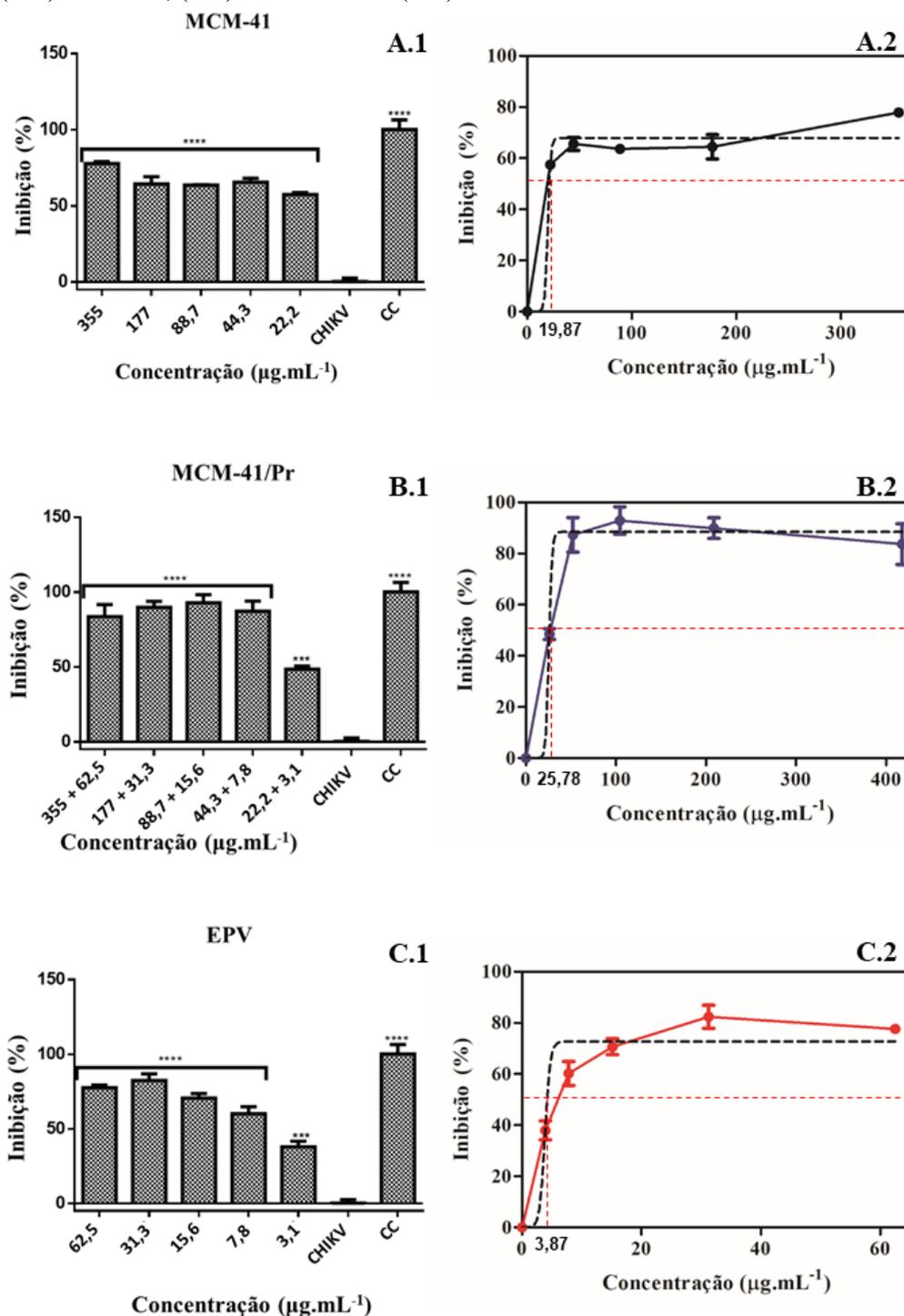
As nanopartículas sintetizadas foram avaliadas quanto a sua atividade antiviral contra CHIKV partindo da concentração máxima não tóxica da MCM-41/Pr ($417,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$), que equivale a $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de EPV e $355 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de MCM-41, considerando-se um grau de encapsulação de EPV de 15% exibindo resultados bastante promissores.

Na Figura 40 pode ser observado que a MCM-41/Pr, MCM-41 e o EPV apresentaram inibição do crescimento do CHIKV, no qual todas as concentrações apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao CHIKV ($p < 0,05$). A MCM-41/Pr em sua maior concentração inibiu a replicação viral em cerca de 83,67%, MCM-41 apresentou uma inibição de 77,84% e o EPV de 77,59%. Observando as concentrações mais baixas avaliadas no ensaio, a porcentagem de inibição do crescimento viral foi de 48,49% para MCM-41/Pr, 57,43% para a MCM-41 e para o EPV de 37,97%.

Analisando-se os resultados obtidos para MCM-41/Pr observou que apenas a concentração de $25,3 \mu\text{g/mL}$ mostrou diferença significativa comparada ao controle celular (CC) ($p < 0,05$) [Figura 40 (B.1)]. Com relação a MCM-41 e ao EPV, houve diferença significativa em comparação ao CC ($p < 0,05$) em todas as concentrações avaliadas [Figura 40 (A.1) e (C.1)].

Também foi calculada a IC_{50} (dose que inibe 50% da replicação viral) para as amostras através de regressão não-linear [Figura 40 (A.2), (B.2) e (C.2)], onde foram encontrados valores de $19,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para MCM-41. A IC_{50} da MCM-41/Pr foi de $25,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o EPV foi encontrado um valor de $3,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que equivale aos 15% do valor de IC_{50} encontrado para MCM-41/Pr.

Figura 40. Ensaio da atividade antiviral contra o vírus Chikungunya das nanopartículas contendo EPV. Atividade antiviral de (A.1) MCM-41, (B.1) MCM-41/Pr e (C.1) EPV com comparação com controle celular (CC) e o vírus Chikungunya (CHIKV). Valores de IC₅₀ calculados por regressão não-linear de (A.2) MCM-41, (B.2) MCM-41/Pr e (C.2) EPV.



Diferenças significativas entre MCM-41 e o grupo controle (CC), MCM-41/Pr e CC e o EPV e CC foram obtidas usando análise de variância *One-way* ANOVA e teste de Tukey de múltiplas comparações. (**** $p < 0,0001$).

Fonte: Autor (2021).

Lani et al. (2016), realizaram um estudo envolvendo os flavonoides baicaleína, fisetina e quercetagina, para avaliação da atividade antiviral contra CHIKV em células Vero. Os três biomarcadores apresentaram ótimos resultados de inibição do crescimento viral, dose dependentes. A IC_{50} calculada para baicaleína, quercetagina e fisetina foi de $1,89 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $13,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $8,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Esses foram comparados com o biomarcador ribavirina que apresentou IC_{50} de $11,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Apresentaram máxima concentração não tóxica para células Vero de $183,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $173,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $>100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para baicaleína, quercetagina e fisetina, respectivamente.

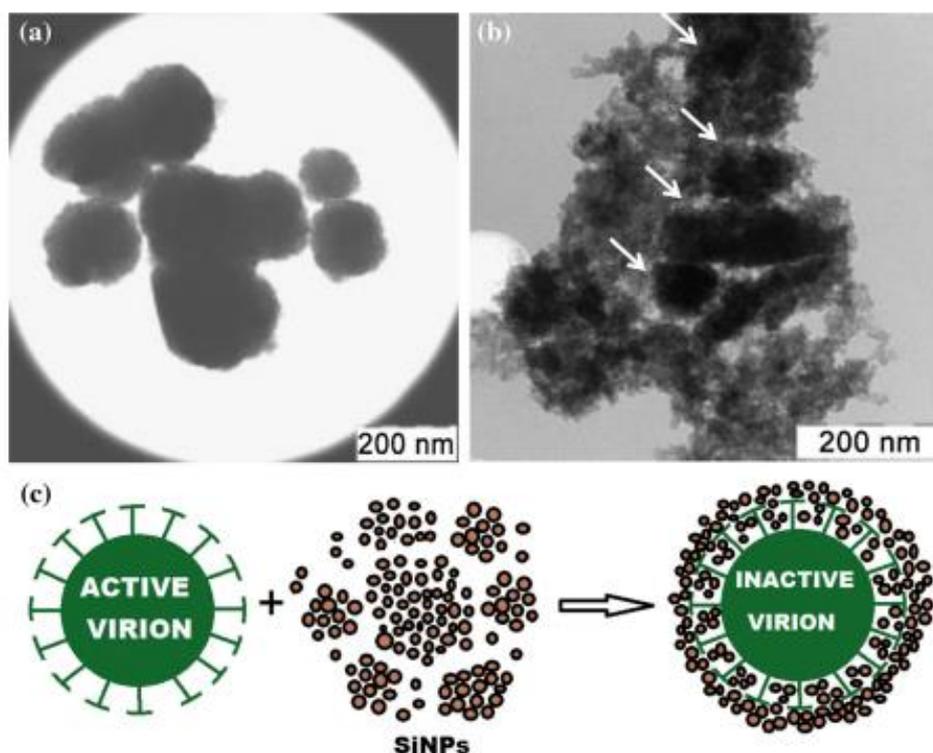
Aguiar (2020) trabalhou com isoflavonoides isolados do extrato da própolis vermelha, vestitol, neovestitol e medicarpina, contra o CHIKV *in vitro*. Vestitol e medicarpina na concentração de $10 \mu\text{M}$ (CMNT) apresentaram inibição do crescimento do vírus estatisticamente significativa de 71% e 51%, respectivamente. O neovestitol não apresentou atividade inibitória significativa.

Mounce et al. (2017) estudaram a curcumina (*Sigma-Aldrich*) avaliando sua capacidade inibitória de infecções com CHIKV. Foi observada uma diminuição significativa do crescimento do vírus em comparação com o grupo controle, com IC_{50} de $3,89 \mu\text{M}$ e a células tratadas foram viáveis até a concentração de $5 \mu\text{M}$ de curcumina.

Há trabalhos na literatura que mencionam a capacidade viricida das nanopartículas de sílica porosas (CHEN e LIANG, 2020). Osminkina et al. (2014) estudaram a atividade antiviral de nanopartículas de sílica porosa (SiNPs) contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e o vírus sincicial respiratório (VSR). As nanopartículas apresentaram uma forte supressão da atividade viral em concentrações um pouco acima de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o HIV ($IC_{50} = 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$) e $0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o VSR ($IC_{50} = 0,005 \text{ mg.mL}^{-1}$).

Os mesmo autores mostraram a interação das SiNPs com os vírions de VSR (Figura 41), os vírions foram diferenciados das SiNPs por difração de elétrons (EDX) no microscópio eletrônico de transmissão (MET). O agredado observado na Figura 41 (B) ocorre provavelmente pela interação não específica entre os grupos hidroxilas presentes na superfície externa dos poros das SiNPs e as glicoproteínas presentes na membrana externa dos vírions, zerando seu potencial elétrico, provocando a aglomeração, que por sua vez provoca a inativação viral, pois o vírus fica impossibilitado de ligar-se ao alvo da célula hospedeira. A interação não específica entre as SiNPs e os vírions [Figura 41 (C)] só é permitida quando a estrutura nanoparticulada é formada por um sistema poroso, sendo os sistemas mesoporosos e microporosos os que apresentam melhor capacidade de supressão viral.

Figura 41. Interação das nanopartículas de sílica porosa com os vírions do VSR. (A) Imagens de MET dos vírions de VSR, (B) MET dos vírions de VSR após interação com as SiNPs, setas indicam os vírions, (C) esquema explanando a ação das SiNPs inibido o vírus.



Fonte: Osminkina et al. (2014).

Lo et al. (2021) incorporaram a curcuma em nanopartículas de sílica mesoporosa revestidas com polímero metacrilato de polietilenoglicol (MSN-EuGd-PEGMA@Cu) e avaliaram a sua capacidade antiviral contra o vírus Zika. A MSN-EuGd-PEGMA@Cu foi usada para tratamento prévio das células a serem infectadas com o vírus. Na concentração de $156 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (contendo $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de curcuma) as células pré-tratadas apresentaram viabilidade celular de 95% após sofrerem infecção com o vírus Zika, ou seja, as nanopartículas puderam inibir o crescimento viral sem causar dano as células. A curcuma na forma livre apresentou 80% de atividade antiviral e as nanopartículas sem curcuma não apresentaram resposta contra o crescimento do vírus, no entanto, a nanopartícula foi revestida com o polímero metacrilato de polietilenoglicol (PEGMA) antes da incorporação da curcuma e, dessa forma, seus poros não encontram-se expostos, impedindo a interação com os vírions do vírus Zika.

Os processos infecciosos dos vírus consistem principalmente na fixação, penetração, replicação e brotamento. As nanopartículas funcionais antivirais trabalham para inibir os vírus, bloqueando ou suprimindo algumas dessas etapas. Inativar os vírus alterando sua estrutura proteica reduzindo a sua virulência, é a maneira mais direta, que pode estar atribuída a mecanismos físicos e químicos. Outra forma de suprimir os vírus é bloquear sua penetração nas

células hospedeiras, alterando a membrana da superfície celular e as estruturas das proteínas. No caso da entrada do vírus na célula, a destruição de sua replicação é a terceira estratégia eficaz para inibir o vírus, o que geralmente é conseguido suprimindo a expressão de certas enzimas que originalmente ajudaram a completar a replicação do DNA ou RNA do vírus. A estratégia final é inibir o brotamento do vírus e eliminá-lo das células hospedeiras (CHEN e LIANG, 2020).

Desta forma, são necessários estudos mais aprofundados para entender como está ocorrendo a interação dos nanomateriais com os vírions do CHIKV no processo de sua supressão. No entanto, foi observado que a atividade antiviral do EPV foi mantida após o processo de encapsulação e devido à concentração tóxica das MCM-41 terem se mostrado na ordem de $709 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (viabilidade celular $> 80\%$), então, MCM-41/Pr podendo ser usada para aplicação em novos métodos biocompatíveis de tratamento antiviral, sobretudo para aqueles sem vacinas ou medicamentos para o tratamento contra a infecção viral.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo relatou a síntese e caracterização das nanopartículas, MCM-41 utilizado como carreador o extrato de própolis vermelha, com a finalidade de melhorar a biodisponibilidade deste produto natural rico em atividade biológica por sua complexa composição química. A síntese da MCM-41 pelo método sol-gel foi facilmente reproduzida, obtendo-se uma estrutura hexagonal p6mm com tamanho de poro de 3,63 nm e tamanho de partícula 210 nm. A área superficial alcançada foi bastante satisfatória reduzindo-se quase a metade após a incorporação do extrato de própolis vermelha. Foi possível observar a presença de aproximadamente 15% de própolis vermelha no MCM-41 através da análise de TG e redução do volume de poros pelo método de BJH. A medida de FTIR mostrou que a estrutura do MCM-41 foi mantida após a incorporação da própolis vermelha, bem como a interação adsorptiva entre o MCM-41 e a própolis vermelha. O resultado de UPLC-DAD mostrou que a estabilidade e as propriedades físico-químicas da própolis vermelha foram mantidas e que a MCM-41/Pr apresentou uma ótima eficiência de encapsulação. A atividade antioxidante revelou que a própolis vermelha presente na MCM-41 manteve suas propriedades antioxidantes. O ensaio de difusão em poço mostrou que o MCM-41/Pr manteve a resposta inibitória do extrato de própolis contra *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli* e apresentou atividade antiviral contra o vírus Chikungunya. Em conclusão, a estrutura mesoporosa de sílica apresenta grande potencial para transportar o extrato de própolis, pois mantém suas propriedades biológicas ativas e ajuda a prolongar a sua estabilidade, protegendo contra a oxidação do produto e sua deterioração. Esses resultados podem ser úteis para o desenvolvimento de medicamentos injetáveis e/ou orais com a capacidade de serem utilizados como materiais teranósticos, pois a nanopartícula de sílica mesoporosa suporta funcionalização devido a sua alta área superficial. Pode também apresentar um grande potencial no investimento em estudos direcionais à área de cosméticos e materiais odontológicos.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAHI, Y. M.; SANI, A. A.; MUSA, B.; GOJE, F. A.; IBRAHIM, A.; NUHU, M.; UMAR, A. H.; BABURO, S. I. B. **Phytochemical analysis and antioxidant properties of amber and red honeybee propolis**. Dutse Journal of Pure and Applied Sciences (DUJOPAS), 6(1), pp. 264-274, 2020.
- AEROIN. **Airbus intensifica o uso de peças produzidas em impressoras 3D na linha A350 XWB**, 2016. Disponível em: <<https://www.aeroin.net/airbus-intensifica-o-uso-de-pecas-produzidas-em-impressoras-3d-na-linha-a350-xwb/>>. Acesso em: 03 de agosto de 2021.
- AGUIAR, J. R. S. **Avaliação da atividade antiviral de isoflavonóides isolados do extrato da própolis vermelha na replicação do vírus chikungunya in vitro**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.
- AHMETAJ-SHALA, B.; PEACOCK, T. P.; BAILLON, L.; SWANN, O. C.; GASHAW, H.; BARCLAY, W. S.; MITCHELL, J. A. **Resistance of endothelial cells to SARS-CoV-2 infection in vitro**. bioRxiv, 2020.
- ALMEIDA, E. T. C.; DA SILVA, M. C. D.; OLIVEIRA, J. M. S.; KAMIYA, R. U.; ARRUDA, R. E. S.; VIEIRA, D. A.; SILVA, V. C.; ESCODRO, P. B.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; DO NASCIMENTO, T. G. **Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with brazilian red propolis extract**. Journal of Pharmaceutical Analysis, 7, pp. 280-287, 2017.
- ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. **Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular**. Metrocamp Pesquisa, 1(1), pp. 37-58, 2007.
- ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. **Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region**. Food Research International, 101, pp. 129-138, 2017.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão**. Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso), 66(1), pp. 1-9, 2007.
- AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. **Effects of Brazilian propolis on Leishmania amazonensis**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 102(2), pp. 215-220, 2007.

AZEVEDO, L. F.; SILVA, P. F.; BRANDÃO, M. P.; DA ROCHA, L. G.; ARAGÃO, C. F. S.; DA SILVA, S. A. S.; PORTO, I. C. C. M.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; FONSECA, E. J. S.; MOURA, M. A. B. F.; DO NASCIMENTO, T. G. **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 , 57(2), pp. 255-270, 2018.

BAEZA, A.; VALLET-REGÍ, M. **Targeted mesoporous silica nanocarriers in oncology.** Current Drug Targets, 19, pp. 213-224, 2018.

BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. **Propolis: recent advances in chemistry and plant origin.** Apidologie, 31(1), pp. 3-15, 2000.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J. K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. **Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities.** Journal of Natural Products, 61(7), pp. 896-900, 1998.

BAPTISTA, P. V.; MCCUSKER, M. P.; CARVALHO, A.; FERREIRA, D. A.; MOHAN, N. M.; MARTINS, M.; FERNANDES, A. R. **Nano-strategies to fight multidrug resistant bacteria—“A battle of the titans”.** Frontiers in Microbiology, 9(1441), pp. 1-26, 2018.

BATISTA, C. M.; ALVES, A. V. F.; QUEIROZ, L. A.; LIMA, B. S.; FILHO, R. N. P.; ARAÚJO, A. A. S.; DE ALBUQUERQUE JÚNIOR, R. L. C.; CARDOSO, J. C. **The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats.** Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology, 180, pp. 198-207, 2018.

BEEVA BRAZIL. **#PrópolisVermelha**, 2021. Disponível em: <<https://www.instagram.com/p/CS9UfzzFeTD/>> Acesso em: 20 de setembro de 2021.

BERNAL, J. L.; ANDREWS, N.; GOWER, C.; GALLAGHER, E.; SIMMONS, R.; THELWALL, S.; STOWE, J.; TESSIER, E.; GROVES, N.; DABRERA, G.; MYERS, R.; CAMPBELL, C.N. J.; AMIRTHALINGAM, G.; EDMUNDS, M.; ZAMBON, M.; BROWN, K. E.; HOPKINS, S.; CHAND, M.; RAMSAY, M. **Effectiveness of Covid-19 vaccines against the B. 1.617. 2 (delta) variant.** New England Journal of Medicine, 385(7), pp. 585-594, 2021.

BINNS, C. **Introduction to nanoscience and nanotechnology.** [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2010.

BISHT, S.; FELDMANN, G.; SONI, S.; RAVI, R.; KARIKAR, C.; MAITRA, A.; MAITRA, A. **Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy**. *Journal of Nanobiotechnology*, 5(3), pp. 1-18, 2007.

BONIFÁCIO, B. V.; DA SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. **Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review**. *International Journal of Nanomedicine*, 9, pp. 1-15, 2014.

BOUCHIKH, N.; ADJDIR, M.; BENDEDDOUCHE, C. K.; RAMDANI, A.; GUEZZEN, B.; TABTI, H. A.; LAKHACHE, E. M.; CHAMI, N. **The influence of the incorporation method and mass ratio of copper on the antibacterial activity of MCM-41**. *Silicon*, pp. 1-8, 2020.

BOYANOVA, L.; GERGOVA, G.; NIKOLOV, R.; DEREJIANI, S.; LAZAROVA, E.; KATSAROV, N.; MITOV, I.; KRASDEV, Z. **Activity of Bulgarian propolis against 94 Helicobacter pylori strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods**. *Journal of Medical Microbiology*, 54(5), pp. 481-483, 2005.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), pp. 25-30, 1995.

BREYER, E. U. **Abelhas e Saúde**. 4^a. ed. Paraná: Uniporto, 1980.

BREZOIU, A.-M.; MATEI, C.; DEACONU, M.; STANCIUC, A. M.; TRIFAN, A.; GASPAR-PINTILIESCU, A.; BERGER, D. **Polyphenols extract from grape pomace. Characterization and valorisation through encapsulation into mesoporous silica-type matrices**. *Food and Chemical Toxicology*, 133, pp. 110787, 2019.

BRITO, C. F. C. **Papel da ciclooxygenase-1 no choque endotóxico**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

BRUSENTOV, N. A.; NIKITIN, L. V.; BRUSENTOVA, T. N.; KUZNETSOV, A. A.; BAYBURTSKIY, F. S.; SHUMAKOV, L. I.; JURCHENKO, N. Y. **Magnetic fluid hyperthermia of the mouse experimental tumor**. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252, pp. 378–380, 2002.

BUENO-SILVA, B.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; MAYER, M. P.A. **Anti-inflammatory mechanisms of neovestitol from Brazilian red propolis in LPS-activated macrophages**. *Journal of Functional Foods*, 36, pp. 440-447, 2017.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; DE ALENCAR, S. M. **Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira.** Química Nova, 32(6), pp. 1523-1527, 2009.

CARTER, J. B.; SAUNDERS, V. A. **Virology: principles and applications.** [S.l.]: Jonh Wiley & Sons, Ltd, 2007.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. **Compostos fenólicos simples e heterosídicos.** In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed, Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2003.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. **Propolis, an old remedy used in modern medicine.** Fitoterapia, 73(1), pp. S1-S6, 2002.

CAVENDISH, R. L.; SANTOS, J. S.; BELO NETO, R.; PAIXÃO, A. O.; OLIVEIRA, J. V.; DE ARAÚJO, E. D.; E SILVA, A. A. B.; THOMAZZI, S. M.; CARDOSO, J. C.; GOMES, M. Z. **Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents.** Journal of Ethnopharmacology, 173, pp. 127-133, 2015.

CCANA-CCAPATINTA, G. V.; MEJÍA, J. A. A.; TANIMOTO, M. H.; GROppo, M.; DE CARVALHO, J. C. A. S.; BASTOS, J. K. **Dalbergia ecastaphyllum (L.) Taub. and Symphonia globulifera L.f.: the botanical sources of isoflavonoids and benzophenones in Brazilian red propolis.** Molecules, 25(9), pp. 2060, 2020.

CHEN, L.; LIANG, J. **An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents.** Materials Science & Engineering C, 112, pp. 110924, 2020.

CHEN, M.; HU, J.; WANG, L.; LI, Y.; ZHU, C.; CHEN, C.; SHI, M.; JU, Z.; CAO, X.; ZHANG, Z. **Targeted and redox-responsive drug delivery systems based on carbonic anhydrase IX-decorated mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy.** Scientific reports, 10(1), pp. 1-12, 2020.

CIT, V. **Manufatura aditiva,** 2018. Disponível em: <<https://medium.com/tend%C3%A2ncias-digitais/manufatura-aditiva-e-suas-diversas-poss%C3%ADveis-aplica%C3%A7%C3%B5es-870bf2452817>>. Acesso em: 03 de agosto de 2021.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.** 4th ed. CLSI standard M27. Clinical

and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, West, Pennsylvania 19087 USA, 2017.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 11th ed. CLSI standard M07. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, West, Pennsylvania 19087 USA, 2018.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. **Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health**. Natural Product Reports, 26, pp. 1001-1043, 2009.

CUESTA-RUBIO, O.; FRONTANA-URIBE, B. A.; RAMÍREZ-APAN, T.; CÁRDENAS, J. **Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of Nemorosone**. Zeitschrift für Naturforschung C, 57(3-4), pp. 372-378, 2002.

CUI, P. H.; DUKE, C. C. **Chemical classification and chemistry of phytotherapeutics constituents**. In: Phytotherapies: Efficacy, Safety, and Regulation. Hoboken, New Jersey, 2015.

DA ROCHA, L. G. **Avaliação da atividade leishmanicida de naftoquinonas naturais modificadas e desenvolvimento de ensaio biológico para avaliar a potência relativa de 1-aza-antraquinonas com atividade leishmanicida**. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

DA SILVA, I. C. M. **Prostaglandina: metabolismo, funções e terapêutica**. Seminário da Disciplina Bioquímica do Tecido Animal. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

DA SILVA, J. M. **Síntese e caracterização de sílica mesoporosa e estudo de liberação controlada de emodina como substância ativa**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2015.

DA SILVA, P. T.; CABRAL, A. **Metabólitos secundários como ferramenta para a sistemática de Angiospermas**. In: VII Botânica de Inverno 2017. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

DAMIAN, L.; PATACHIA, S. **Method for testing the antimicrobial character of the materials and their fitting to the scope**. Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Engineering Sciences. Series I, 7(2), pp. 37-44, 2014.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. **Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin**. Advance Access Publication, 5(4), pp. 435-441, 2008.

DE MÉLO SILVA, I. S.; GASPAR, L. M. A. C.; ROCHA, A. M. O.; DA COSTA, L. P.; TADA, D. B.; FRANCESCHI, E.; PADILHA, F. F. **Encapsulation of red propolis in polymer nanoparticles for the destruction of pathogenic biofilms**. Aaps Pharmscitech, 21(2), pp. 1-9, 2020.

DE OLIVEIRA, J. R. **Ensaio de citotoxicidade de extratos naturais após determinação da concentração microbiana mínima para Staphylococcus spp., Streptococcus mutans e Candida spp.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2011.

DE REZENDE, F. M.; ROSADO, D.; MOREIRA, F. A.; DE CARVALHO, W. R. S. **Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas**. In: VI Botânica no Inverno 2016. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

DE VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; DA COSTA, M. M.; E SILVA, M. S.; VIANA, L. R. **Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis**. Ciência Rural, 34(1), pp. 159-163, 2004.

DO NASCIMENTO, T. G.; SILVA, P. F.; AZEVEDO, L. F.; DA ROCHA, L. G.; PORTO, I. C. C. M.; E MOURA, T. F. A. L.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B.; FONSECA, E. J. S.; OLIVEIRA, E. J.; ZHANG, A. T.; WATSON, D. G. **Polymeric nanoparticles of Brazilian red propolis extract: preparation, characterization, antioxidant and leishmanicidal activity**. Nanoscale Research Letters, 11(1), pp. 301, 2016.

DO NASCIMENTO, T. G.; ARRUDA, R. E. S.; ALMEIDA, E. T. C.; OLIVEIRA, J. M. S., BASÍLIO-JÚNIOR, I. D.; PORTO, I. C. C. M.; SABINO, A. R.; TONHOLO, J.; GRAY, A.; EBEL, R. E.; CLEMENTS, C.; ZHANG, T.; WATSON, D. G. **Comprehensive multivariate correlations between climatic effect, metabolite-profile, antioxidant capacity and antibacterial activity of Brazilian red propolis metabolites during seasonal study**. Scientific Reports, 9(1), pp. 1-16, 2019.

DOS SANTOS, D. A.; MUNARI, F. M.; FROZZA, C. O. S.; MOURA, S.; BARCELLOS, T.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCH-ELY, M. **Brazilian red propolis extracts: study of chemical composition by ESI-MS/MS (ESI+) and cytotoxic profiles against colon cancer cell lines**. Biotechnology Research and Innovation, 3, pp. 120-130, 2019.

DOS SANTOS, I. M. D.; PEREIRA, S. P.; MEZACASA, A. V.; CACERES, O. I. A.; TIMOTEO, F.; LOPES, A. S.; DEL PINO, K. F.; DUARTE, A. P.; CARDOSO, T. F. M.; DE CASTRO, G. R.; RASHID, H. U.; MARTINES, M. A. U. **Emodin-containing MCM-41 type mesoporous silica nanoparticle drug delivery system**. *Theoretical and Experimental Chemistry*, 56(3), pp. 164-171, 2020.

DOS SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed, Editora da UFRGS / Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2003.

DUNCAN, A. M.; PHIPPS, W. R.; KURZER, M. S. **Phyto-oestrogens**. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism*, 17(2), pp. 253-271, 2003.

DURAN, G.; DURAN, N.; CULHA, G.; OZCAN, B.; OZTAS, H.; OZER, B. **In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on Leishmania tropica: a preliminary study**. *Parasitology Research*, 102(6), pp. 1217-1225, 2008.

DURAN, N.; MUZ, M.; CULHA, G.; DURAN, G.; OZER, B. **GC-MS Analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types**. *Parasitology Research*, 108(1), pp. 95-105, 2011.

EID, A.; HESTER, J.; FANG, Y.; TEHRANI, B.; NAUROZE, S. A.; BAHR, R.; TENTZERIS, M. M. **Nanotechnology-empowered flexible printed wireless electronics: a review of various applications of printed materials**. *IEEE Nanotechnology Magazine*, 13(1), pp. 18-29, 2019.

EIGLER, D. M.; SCHWEIZER, E. K. **Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope**. *Nature*, 344, pp. 524-526, 1990.

FARJADIAN, F.; ROOINTAN, A.; MOHAMMADI-SAMANI, S.; HOSSEINI, M. **Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, pharmaceutical applications, biodistribution, and biosafety assessment**. *Chemical Engineering Journal*, 359, pp. 684-705, 2019.

FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. **Impact of nanotechnology on drug delivery**. *ACS nano*, 3(1), pp. 16-20, 2009.

FERREIRA, C. A. **Síntese de nanopartículas magnéticas e aplicação na minimização de impactos ambientais na agroindústria**. Trabalho de Conclusão de Curso. Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2015.

FEYNMAN, R. P. **There is plenty of room at the bottom**. In: Introduction to Nanoscience. [S.l.]: Oxford, 2010.

FISCHER, G.; HÜBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. **Imunomodulação pela própolis**. Arquivos do Instituto Biológico, 75(2), pp. 247-253, 2008.

FREIRES, I. A.; QUEIROZ, V. C. P. P.; FURLETTI, V. F.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M.; DUARTE, M. C. T.; ROSALEN, P. L. **Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against Candida spp**. Journal de Mycologie Médicale, 26, pp. 122-132, 2016.

FREIRES, I. A.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. **A pharmacological perspective on the use of Brazilian red propolis and its isolated compounds against human diseases**. European Journal of Medicinal Chemistry, 110, pp. 267-279, 2016.

FRÖBA, M.; HOFFMANN, F.; CORNELIUS, M.; MORELL, J. **Silica-based mesoporous organic–inorganic hybrid materials**. Angewandte Chemie International Edition, 45(20), pp. 3216-3251, 2006.

FROZZA, C. O. S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; DE SOUZA, M. D. O.; SALVADOR, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCH-ELY, M. **Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis**. Food and Chemical Toxicology, 52, pp. 137-142, 2013.

GAN, Q.; ZHU, J.; YUAN, Y.; LIU, H.; QIAN, J.; LI, Y.; LIU, C. **A dual-delivery system of pH-responsive chitosan-functionalized mesoporous silica nanoparticles bearing BMP-2 and dexamethasone for enhanced bone regeneration**. Journal of Materials Chemistry B, 3, pp. 2056-2066, 2015.

GOH, V. S. L.; MOK, C.-K.; CHU, J. J. H. **Antiviral natural products for arbovirus infections**. Molecules, 25, pp. 2796, 2020.

GOMES, L. M.; MOYSÉS, D. A.; NASCIMENTO, H. F. S.; MOTA, T. C.; BONFIM, L. T.; CARDOSO, P. C. S.; BURBANO, R. M. R.; BAHIA, M. O. **Genotoxic and cytotoxic effects of the drug dipyrone sodium in African green monkey kidney (Vero) cell line exposed in vitro**. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 394, pp. 1529-1535, 2021.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Resistência do organismo a infecção: I. Leucócitos, granulócitos, o sistema monócito-macrófago e inflamação**. In: Tratado de Fisiologia Médica. 9ª. ed, Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1997.

HENDI, N.K.K.; NAHER, H.S.; AL-CHARRAKH, A.H. **In vitro antibacterial and antifungal activity of Iraqi propolis**. Journal of medicinal plants research, 5(20), pp. 5058-5066, 2011.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. **Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxygenase 2**. Jornal de Pediatria, 82(5), pp. S206-S212, 2006.

HUANG, L.; MA, J.; WANG, X.; ZHANG, P.; YU, L.; ZHANG, S. **Mesoporous silica nanoparticles-loaded methyl3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propanoate as a smart antioxidant of synthetic ester oil**. Tribology International , 121, pp. 114-120, 2018.

IJIMA, S. **Helical microtubules of graphitic carbon**. Nature, 354(6348), pp. 56-58, 1991.

IJIMA, S.; ICHIHASHI, T. **Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter**. Nature, 363(6430), pp. 603-605, 1993.

JAIN, H.; CHELLA, N. **Methods to improve the solubility of therapeutical natural products: a review**. Environmental Chemistry Letters, pp. 1-11, 2020.

JIANG, D.; RASUL, A.; BATOOL, R.; SARFRAZ, I.; HUSSAIN, G.; MATEEN TAHIR, M.; QIN, T.; SELAMOGLU, Z.; ALI, M.; LI, J.; LI, X. **Potential anticancer properties and mechanisms of action of formononetin**. BioMed Research International, 2019, pp. 1-11, 2019.

JONH, L. **Contra o sol, a calvície e o Mal de Parkinson, própolis vermelha**, 2016. Disponível em: <<https://conexaoplaneta.com.br/blog/contra-o-sol-e-a-calvicie-e-mal-de-parkinson-propolis-vermelha/#fechar>>. Acesso em: 28 de setembro de 2021.

JR, C. **Aplicações da Manufatura aditiva na Indústria 4.0**, 2020. Disponível em: <<https://www.cimatecjr.com.br/aplicacoes-da-manufatura-aditiva-na-industria-40-45>>. Acesso em: 03 de agosto de 2021.

JUNIOR, W. B.; MIRANDA, E. O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D. W.; PORFIRIO, Z. **Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil**. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, 33(1), pp. 3-10, 2012.

KARAKAYA, S. **Bioavailability of Phenolic Compounds**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, pp. 453-464, 2004.

KARSLI-CEPPIOGLU, S.; NGOLLO, M.; JUDES, G.; PENAULT-LLORCA, F.; BIGNON, YVES-JEAN; G., LAURENT; BERNARD-GALLON, D. **The role of soy phytoestrogens on genetic and epigenetic mechanisms of prostate cancer**. In: *The Enzymes: mechanism of the anticancer effect of phytochemicals*. 5^a. ed. [S.l.]: Elsevier, 2015.

KERMANNEZHAD, K.; CHERMAHINI, A. N.; MOMENI, M. M.; REZAEI, B. **Application of amine-functionalized MCM-41 as pH-sensitive nano container for controlled release of 2-mercaptobenzoxazole corrosion inhibitor**. *Chemical Engineering Journal*, 306, pp. 849-857, 2016.

KETTERMANN, V. **Manufatura aditiva de metais/Impressão 3D com metais**, 2018. Disponível em: <<https://engenhierodemateriais.com.br/2018/06/21/manufatura-aditiva-de-metais-impresao-3d-com-metais/>>. Acesso em: 03 de agosto de 2021.

KOSARIC, J. V.; CVETKOVIC, D. M.; ZIVANOVIC, M. N.; CURCIC, M. G.; SEKLIC, D. S.; BUGARCIC, Z. M.; MARKOVIC, S. D. **Antioxidative and antiproliferative evaluation of 2-(phenylselenomethyl)tetrahydrofuran and 2-(phenylselenomethyl)tetrahydropyran**. *J BUON*, 19(1), pp. 283-290, 2014.

KWON, M. J.; SHIN, H. M.; PERUMALSAMY, H.; WANG, X.; AHN, Y.-J. **Antiviral effects and possible mechanisms of action of constituents from Brazilian propolis and related compounds**. *Journal of Apicultural Research*, 59(4), pp. 413-425, 2020.

LANI, R.; HASSANDARVISH, P.; SHU, M.-H.; PHOON, W. H.; CHU, J. J. H.; HIGGS, S.; VANLANDINGHAM, D.; BAKAR, S. A.; ZANDI, K. **Antiviral activity of selected flavonoids against Chikungunya virus**. *Antiviral Research*, 133, pp. 50-61, 2016.

LI, Z.; BARNES, J. C.; BOSOY, A.; STODDART, J. F.; ZINK, J. I. **Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications**. *Chemical Society Reviews*, 41(7), pp. 2590–2605, 2012.

LIMA, I. J. C. **Propriedades de agregação do composto bioativo Artepilina C e interações com agregados anfífilos de interesse biológico**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

LINDSAY, S. M. **Introduction to Nanoscience**. [S.l.]: Oxford, 2010.

- LO, T.-H.; WU, Z.-Y.; CHEN, S.-Y.; MENG, F.-Y.; CHOU, P.-T.; WANG, C.-M.; LIN, H.-M. **Curcumin-loaded mesoporous silica nanoparticles with dual-imaging and temperature control inhibits the infection of Zika virus**. *Microporous and Mesoporous Materials*, 314, pp. 110886, 2021.
- LOPES, W.A.; FASCIO, M. **Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho**. *Química nova*, 27(4), pp. 670-673, 2004.
- LÓPEZ, B. G.-C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. **Phytochemical markers of different types of red propolis**. *Food Chemistry*, 146, pp. 174-180, 2014.
- LU, J.; LIONG, M.; LI, Z.; ZINK, J. I.; TAMANOI, F. **Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals**. *Small*, 6(16), pp. 1794-1805, 2010.
- LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. **Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(3), pp. 447-454, 2008.
- LV, X.; ZHANG, L.; XING, F.; LIN, H. **Controlled synthesis of monodispersed mesoporous silica nanoparticles: particle size tuning and formation mechanism investigation**. *Microporous and Mesoporous Materials*, 225, pp. 238-244, 2016.
- MACHADO, H. **Atividade dos flavonoides rutina e naringina sobre tumor ascítico de Ehrlich "in vivo"**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.
- MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME, D. M. **Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA**. *Embrapa Florestas-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, 427, 2018.
- MAMAEVA, V.; SAHLGREN, C.; LINDÉN, M. **Mesoporous silica nanoparticles in medicine—Recent advances**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, pp. 689-702, 2013.
- MARCUCCI, M. C. **Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis**. *Química Nova*, 19(5), pp. 529-536, 1996.

MARCUCCI, M. C.; RODRIGUEZ, J.; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S. **Chemical composition of brazilian propolis from Sao Paulo State**. Zeitschrift für Naturforschung, 53c, pp. 117-119, 1998.

MARCUCCI, M. C.; OLIVEIRA, L. F. A. M.; GONÇALVES, C. P.; DE CARVALHO, C. **Espectroscopia uv-vis e reação com o radical dpph para a detecção de flavonoides e determinação do potencial antioxidante de extratos de própolis**. Funvic, 2020.

MARTINI, D.; BARBOSA, G. F.; MATIAS, R.; MARQUES FILHO, W. C.; GARCIA, N. Z. T. **Seasonality on the antifungal potential of green propolis collected in Campo Grande – MS, Brazil**. Ciência Rural, 47(3), pp. 1-6, 2017.

MATSHITSE, R. **Brunauer-Emmett-Teller (BET) surface area analysis**. Rhodes Univ. [S.l.]. 2017.

MEYER, J. M.; REZENDE, F. M.; SOARES, S. A.; TOMBA, A. C. B. **Metabolismo secundário**. In: Botânica no Inverno 2013. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MICHALICK, M. S. M. **Gênero Leishmania**. In: Parasitologia Humana. 11^a. ed. Atheneu, São Paulo, 2005.

MIE, G. **Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen**. Annalen der physik, 330(3), pp. 377-445, 1908.

MITRAN, R.-A.; DEACONU, M.; MATEI, C.; BERGER, D. **Mesoporous silica as carrier for drug-delivery systems**. In: Nanocarriers for Drug Delivery. [S.l.]: Elsevier, 2019.

MOREIRA, L. L.; DIAS, T.; DIAS, L. G.; ROGÃO, M.; DA SILVA, J. P.; ESTEVINHO, L. M. **Propolis influence on erythrocyte membrane disorder (hereditary spherocytosis): A first approach**. Food and Chemical Toxicology, 49, pp. 520–526, 2011.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of Immunological Methods, 65(1-2), pp. 55-63, 1983.

MOUNCE, B. C.; CESARO, T; CARRAU, L; VALLET, T.; VIGNUZZI, M. **Curcumin inhibits Zika and chikungunya virus infection by inhibiting cell binding**. Antiviral Research, 142, pp. 148-157, 2017.

MOYNA, P.; HEINZEN, H. **Lípidios: Química y productos naturales que los contienen.** In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2003.

MUSCHIETTI, L. V.; MARTINO, V. S. **Actividades biológicas de los flavonoides naturales.** In: Química de produtos naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia. 4ª ed, Univali, Itajaí, SC, 2014.

NADERI, M. **Surface Area: Brunauer–Emmett–Teller (BET).** In: Progress in filtration and separation. [S.l.]: Academic Press, 2015.

NANI, B. D.; FRANCHIN, M.; LAZARINI, J. G.; FREIRES, I. A.; DA CUNHA, M. G.; BUENO-SILVA, B.; DE ALENCAR, S. M.; MURATA, R. M.; ROSALEN, P. L. **Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: a pharmacogenomic analysis.** *Phytotherapy Research*, 32, pp. 750-754, 2018.

NARAYAN, R.; NAYAK, U.Y.; RAICHUR, A. M.; GARG, S. **Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances.** *Pharmaceutics*, 10(3), pp. 118, 2018.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. S. O.; RUFINO, D. A.; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM NETO, P. J. **Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artermia salina*.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2B), pp. 524-529, 2009.

OLIVEIRA, L. M. T. M.; OLIVEIRA, L. F. A. M.; SONSIN, A. F.; DUARTE, J. L. S.; SOLETTI, J. I.; FONSECA, E. J. S.; RIBEIRO, L. M. O.; MEILI, L. **Ultrafast diesel oil spill removal by fibers from silk-cotton tree: Characterization and sorption potential evaluation.** *Journal of Cleaner Production*, 263, pp. 121448, 2020.

OSMINKINA, L. A.; TIMOSHENKO, V. Y.; SHILOVSKY, I. P.; KORNILAEVA, G. V.; SHEVCHENKO, S. N.; GONGALSKY, M. B.; TAMAROV, K. P.; ABRAMCHUK, S. S.; NIKIFOROV, V. N.; KHAITOV, M. R.; KARAMOV, E. V. **Porous silicon nanoparticles as scavengers of hazardous viruses.** *Journal of Nanoparticle Research*, 16, pp. 2430, 2014.

OZBILGE, H.; KAYA, E. G.; ALBAYRAK, S.; SILICI, S. **Anti-leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis.** *African Journal of Microbiology Research*, 4(7), pp. 556-560, 2010.

PAGANOTTI, R. S. N. **Desenvolvimento de métodos analíticos para a análise da própolis utilizando técnicas espectrométricas e análise multivariada.** Tese de Doutorado. Instituição de Ciências Exatas, Belo Horizonte, 2013.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. **Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp. 1100-1103, 2004.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. **Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 2502-2506, 2002.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M. **Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas.** *Mensagem doce*, 58(9), pp. 3-7, 2000.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy.** 4^a ed, Cengage Learning, Boston (MA), 2013.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; FERNANDEZ, M. C.; RASTRELLI, L. **Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, pp. 6484-6491, 2011.

PINTO, L. D. M. A.; DO PRADO, N. R. T.; DE CARVALHO, L. B. **Propriedades, usos e aplicações da própolis.** *Revista Eletrônica de Farmácia*, VIII(3), pp. 76-100, 2011.

PLATAFORMA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA. **Universidade Federal Fluminense**, 2021. Disponível em: <<http://www.meib.uff.br/?q=content/breve-hist%C3%B3rico-do-microsc%C3%B3pio-eletr%C3%B4nico>>. Acesso em: 28 de setembro de 2021.

POBIEGA, K.; GNIEWOSZ, M.; KRAŚNIEWSKA, K. **Antimicrobial and antiviral properties of different types of propolis.** *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 589, pp. 69-79, 2017.

POOLE JR., C. P.; OWENS, F. J. **Introduction to Nanotechnology.** 1^a ed, John Wiley & Sons, 2003.

POPOVA, M.; SZEGEDI, A.; YONCHEVA, K.; KONSTANTINOV, S.; PETROVA, G. P.; ALEKSANDROV, H. A.; VAYSSILOV, G. N.; SHESTAKOVA, P. **New method for preparation of delivery systems of poorly soluble drugs on the basis of functionalized mesoporous MCM-41 nanoparticles.** *Microporous and mesoporous materials*, 198, pp. 247-255, 2014.

POPOVA, M.; LAZAROVA, H.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; MIHÁLY, J.; NAJDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; SZEGEDI, A. **Nanostructured silver silica materials as potential propolis carriers.** *Microporous and Mesoporous Materials*, 263, pp. 28-33, 2018.

PRASAD, R.; BANDYOPADHYAY, T. K. **Nanotechnology patents in the automotive industry (a quantitative & qualitative analysis).** *Recent Patents on Nanotechnology*, 8, pp. 200-214, 2014.

PRATT, C. W.; CORNEY, K. **Essential Biochemistry.** Tradução de Antônio José Magalhães da Silva Moreira; João Paulo de Campos e Motta Paulo A. 1ª ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

PROGRAMA Arboretum. **Programa Arboretum de Conservação e Restauração da Diversidade Florestal**, 2019. Disponível em: <<https://www.programaarboretum.eco.br/especie/83/guanandi>>. Acesso em: 27 de setembro de 2021.

PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. **Antibacterial properties of propolis.** *Molecules*, 24(11), pp. 2047, 2019.

QUEIROZ, S. C. N.; NOGUEIRA, R. T.; SCRAMIN, S. **Importância dos fitoestrógenos, presentes na soja, para a saúde humana.** EMBRAPA. Jaguariúna, pp. 4. 2006.

RAMSDEN, J. J. **Nanotechnology: an introduction.** [S.l.]: Elsevier, 2011.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. **Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities.** *Journal Science Food Agriculture*, 91, pp. 2363-2370, 2011.

RIPARI, N.; SARTORI, A. A.; HONORIO, M. S.; CONTE, F. L.; TASCA, K. I.; SANTIAGO, K. B.; SFORCIN, J. M. **Propolis antiviral and immunomodulatory activity: a review and perspectives for COVID-19 treatment.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 73, pp. 281-299, 2021.

RÓZ, A. L.; LEITE, F. L.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA JÚNIOR, O. N. **Nanoestruturas: Princípios e Aplicações**. 1ª ed, Elsevier, Rio de Janeiro, 2015.

RUFATTO, L. C.; DOS SANTOS, D. A.; MARINHO, F.; HENRIQUE, J. A. P.; ELY, M. R.; MOURA, S. **Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity**. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 7(7), pp. 591–598, 2017.

RUFATTO, L. C.; LUCHTENBERG, P.; GARCIA, C.; THOMASSIGNY, C.; BOUTTIER, S.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCH-ELY, M.; DUMAS, F.; MOURA, S. **Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation**. Microbiological Research, 214, pp. 74-82, 2018.

SALVIANO, A. B. **Modificação dos mesoporos da sílica MCM-41 com oxi-hidróxido de ferro e cálcio para aplicação em processos de adsorção**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2017.

SANTOS, S. D. C.; DE MELLO, J. C. P. **Taninos**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5ª ed, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2003.

SAROJ, S.; RAJPUT, S. J. **Tailor-made pH-sensitive polyacrylic acid functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient and controlled delivery of anti-cancer drug Etoposide**. Drug development and industrial pharmacy, 44(7), p. 1198-1211, 2018.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A. R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S. S. **Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study**. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, 56(3), pp. 501-505, 2003.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. **Propolis: is there a potential for the development of new drugs?** Journal of Ethnopharmacology, 133, pp. 253–260, 2011.

SHAW, D. J. **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 4ª ed, [S.l.]: Butterworth-Heinemann, 1992.

SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G.; PETERS, H. A.; FOEKENS, J. A. **The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival**. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 33(11), pp. 813-823, 1995.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. **Chemical composition and botanical origin of red propolis a new type of brazilian propolis**. Evidence-based complementary and alternative medicine, 5(3), pp. 313-316, 2008.

SILVA, P. F. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo extrato de própolis vermelha de alagoas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2015.

SILVA, R. P.; MACHADO, B. A. S.; BARRETO, G. A.; COSTA, S. S.; ANDRADE, L. N.; AMARAL, R. G.; CARVALHO, A. A.; PADILHA, F. F., BARBOSA, J. D. V.; UMSZAGUEZ, M. A. **Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts**. PLoS ONE, 12(3), pp. 1-18, 2017.

SILVA-BELTRÁN, N. P.; BALDERRAMA-CARMONA, A. P.; UMSZAGUEZ, M. A.; MACHADO, B. A. S. **Antiviral effects of Brazilian green and red propolis extracts on Enterovirus surrogates**. Environmental Science and Pollution Research, 27, pp. 28510-28517, 2020.

SILVA FILHO, P. M. **Síntese de nanopartículas de sílica carregadas positivamente e estudo de adsorção de fármacos aniônicos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2016.

SILVEIRA, T. **Calcinação e estabilidade térmica de sílicas mesoporosas preparadas com Pluronic P123**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2013.

SLOWING, I. I.; VIVERO-ESCOTO, J. L.; TREWYN, B. G.; LIN, V. S.-Y. **Mesoporous silica nanoparticles: structural design and applications**. Journal of Materials Chemistry, 20(37), pp. 7924-7937, 2010.

SUGIMOTO, M. A.; VAGO, J. P.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. **Mediators of the resolution of the inflammatory response**. Trends in immunology, 40(3), p. 212-227, 2019.

SUN, L. N.; LU, L. X.; QIU, X. L.; TANG, Y. L. **Development of low-density polyethylene antioxidant active films containing α -tocopherol loaded with MCM-41 (Mobil Composition of Matter No. 41) mesoporous silica**. Food Control, 71, pp. 193-199, 2017.

SZEGEDI, A.; POPOVA, M.; GOSHEV, I.; KLÉBERT, S.; MIHÁLY, J. **Controlled drug release on amine functionalized spherical MCM-41**. *Journal of Solid State Chemistry*, 194, pp. 257-263, 2012.

TANG, F.; LI, L.; CHEN, D. **Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery**. *Advanced Materials*, 24, pp. 1504-1534, 2012.

TAZAWA, S.; WARASHINA, T.; NORO, T.; MIYASE, T. **Studies on the constituents of brazilian propolis**. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 46(9), pp. 1477-1479, 1998.

TAZAWA, S.; TSUTOMU, W.; NORO, T. **Studies on the constituents of brazilian propolis. II**. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47(10), pp. 1388-1392, 1999.

THOMMES, M.; KANEKO, K.; NEIMARK, A. V.; OLIVIER, J. P.; RODRIGUEZ-REINOSO, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K. S. **Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report)**. In: _____ *Pure and Applied Chemistry*. 9-10^a ed, [S.l.]: [s.n.], 2015.

TOMAR, R. S.; JYOTI, A.; KAUSHIK, S. (Eds.). **Nanobiotechnology: Concepts and Applications in Health, Agriculture and Environment**. [S.l.]: [s.n.], 2020.

TOMAZZOLI, M. M.; ZEGGIO, A. R. S.; PAI NETO, R. D.; SPECHT, L.; COSTA, C.; ROCHA, M.; YUNES, R. A.; MARASCHIN, M. **Botanical source investigation and evaluation of the effect of seasonality on Brazilian propolis from *Apis mellifera* L.** *Scientia Agricola*, 77(6), pp. 1-8, 2020.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; RODRIGUEZ, J. G.; BANKOVA, V. **New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis**. *Fitoterapia*, 75, pp. 683–689, 2004.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. **Bioactive constituents of brazilian red propolis**. *Advance Access Publication*, 3(2), pp. 249-254, 2006.

TZANKOV, B.; TZANKOVA, V.; ALUANI, D.; YORDANOV, Y.; SPASSOVA, I.; KOVACHEVA, D.; AVRAMOVA, K.; VALOTI, M.; YONCHEVA, K. **Development of MCM-41 mesoporous silica nanoparticles as a platform for pramipexole delivery**. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, pp. 26-35, 2019.

VASCONCELOS, C. C.; COSTA, J. B. P.; RIBEIRO, G. G.; GUEDES, A. C. L.; GUEDES, M. C. **Frutos e sementes de *Symphonia globulifera* L. f. (Clusiaceae) em floresta de várzea do estuário Amazônico.** [S.l.]. 2014.

VEIGA, R. S.; DE MENDONÇA, S.; MENDES, P. B.; PAULINO, N.; MIMICA, M. J.; LAGAREIRO NETTO, A. A.; LIRA, S.; LÓPEZ, B. G.-C.; NEGRÃO, V.; MARCUCCI, M. C. **Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC.** Journal of Applied Microbiology, 122, pp. 911-920, 2017.

VIVERO-ESCOTO, J. L.; HUXFORD-PHILLIPS, R. C.; LIN, W. **Silica-based nanoprobe for biomedical imaging and theranostic applications.** Chemical Society Reviews, 41(7), pp. 2673-2685, 2012.

VUKOVIC, N. L.; OBRADOVIC, A. D.; VUKIC, M. D.; JOVANOVIC, D.; DJURDJEVIC, P. M. **Cytotoxic, proapoptotic and antioxidative potential of flavonoids isolated from propolis against colon (HCT-116) and breast (MDA-MB-231) cancer cell lines.** Food Research International, 106, pp. 71-80, 2018.

WAGNER, E. K.; HEKLETT, M. J.; BLOOM, D. C.; CAMERINI, D. **Basic Virology.** 3rd ed, [S.l.]: Blackwell Publishing, 2008.

WAKS, A. G.; WINER, E. P. **Breast cancer treatment: a review.** Jama, 321(3), pp. 288-300, 2019.

WANG, Y.; ZHAO, Q.; HAN, N.; BAI, L.; LI, J.; LIU, J.; CHE, E.; HU, L.; ZHANG, Q.; JIANG, T.; WANG, S. **Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications.** Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 11(2), pp. 313-327, 2015.

WHO, World Health Organization. **Cancer.** Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 08 de julho de 2020.

WHO, World Health Organization. **Cancer Today - Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2018.** Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-sunburst?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&population_s=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1>. Acesso em: 08 de julho de 2020.

WHO, World Health Organization. **World Health Organization**, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/chikungunya#tab=tab_3>. Acesso em: 29 de julho de 2021.

WILLYARD, C. **The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats**. Nature News, 543(7643), pp. 15, 2017.

WOLIŃSKA-GRABCZYK, A.; WÓJTOWICZ, M.; JANKOWSKI, A.; GRABIEC, E.; KUBICA, P.; MUSIOŁ, M.; SOBOTA, M. **Synthesis, characterization, and gas permeation properties of thermally rearranged poly(hydroxyimide)s filled with mesoporous MCM-41 silica**. Polymer, 158, pp. 32-45, 2018.

WONG, E. **The Isoflavonoids**. In: The Flavonoids. 1^a ed, [S.l.]: Springer, 1975.

WU, S.-H.; MOU, C.-Y.; LIN, H.-P. **Synthesis of mesoporous silica nanoparticles**. Chemical Society Reviews, 42, pp. 3862-3875, 2013.

YANG, B.; CHEN, Y.; SHI, J. **Mesoporous silica/organosilica nanoparticles: synthesis, biological effect and biomedical application**. Materials Science and Engineering: R: Reports, 137, pp. 66-105, 2019.

YILDIRIM, A.; DURAN, G. G.; DURAN, N.; JENEDI, K.; BOLGUL, B. S.; MIRALOGLU, M.; MUZ, M. **Antiviral activity of hatay propolis against replication of Herpes simplex virus type 1 and type 2**. Medical Science Monitor, 22, pp. 422-430, 2016.

YUAN, H.; MA, Q.; YE, L.; PIAO, G. **The traditional medicine and modern medicine from natural products**. Molecules, 21(5), pp. 559, 2016.

ZHANG, J. Z.; WANG, Z.-L.; LIU, J.; CHEN, S.; LIU, G.-Y. **Self-Assembled Nanostructures**. Springer Science & Business Media, New York, 2003.

ZHANG, Y.; SHAREENA DASARI, T. P.; DENG, H.; YU, H. **Antimicrobial activity of gold nanoparticles and ionic gold**. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 33(3), p. 286-327, 2015.

ZHAO, L.; QIN, H.; WU, R.; ZOU, H. **Recent advances of mesoporous materials in sample preparation**. Journal of Chromatography A, 1228, pp. 193-204, 2012.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonóides**. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5^a ed, Editora de UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2003.