

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
ASSOCIAÇÃO AMPLA ENTRE UNICENTRO/UEPG

LAÍS DE ALMEIDA CAMPOS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE
LECITINA E ÁCIDO OLEICO PARA ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS**

GUARAPUAVA

2020

LAÍS DE ALMEIDA CAMPOS

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOEMULSÃO A BASE DE
LECITINA E ÁCIDO OLEICO PARA ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, da UNICENTRO.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

GUARAPUAVA

2020

C198o Campos, Laís de Almeida
Obtenção e caracterização de nanoemulsão a base de lecitina e ácido oleico para encapsulação de extrato etanólico de própolis / Laís de Almeida Campos – Guarapuava, 2020.
xiv, 80 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2020.

Orientador: Najeh Maissar Khalil
Banca examinadora: Adriana Knob, João Paulo Niemes

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Nanopartículas. 3. Produtos naturais. 4. Antifúngico. 5. Compostos fenólicos totais. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615



Universidade Estadual do Centro-Oeste

Reconhecida pelo Decreto Estadual nº 3 444, de 8 de agosto de 1997

TERMO DE APROVAÇÃO

Laís de Almeida Campos

“Obtenção e Caracterização de Nanoemulsão a base de Lecitina e Ácido Oléico para Encapsulação de Extrato Etanólico de Própolis”.

Dissertação aprovada em 20/02/2020 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil, UNICENTRO.
Presidente

Dr. João Paulo Niemes.
Membro

Prof.ª Dr.ª Adriana Knob, UNICENTRO.
Membro

Guarapuava - PR
2020.

Home Page <http://www.unicentro.br>

Campus Santa Cruz: Rua Salvatore Renna – Padre Salvador, 875 – Cx. Postal 3010 – Fone (42) 3621-1000 – FAX (42) 3621-1090 – CEP 85 015-430 – GUARAPUAVA – PR

Campus CEDETEG: Rua Simeão Camargo Varela de Sá, 03 – Fone/FAX (42) 3629-8100 – CEP 85 040-080 – GUARAPUAVA – PR

Campus de Irati: PR 153 – Km 07 – Riozinho – Cx. Postal, 21 – Fone (42) 3421-3000 – FAX (42) 3421-3067 – CEP 84 500-000 – IRATI – PR

Totus tuus Mariae

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me sustentar em bondade, misericórdia e amor. Obrigada Pai, por toda graça e fidelidade. Obrigada pela oportunidade de ser Seu instrumento durante essa etapa da minha vida.

À minha família, por todo amor, cuidado, proteção e apoio. Por serem minha fortaleza Obrigada Mãe, Davi e Nicolas por confiarem em mim, por se alegrarem da minha alegria e me segurarem nas dificuldades. Amo vocês!

Ao Lucas, por ser uma pessoa segundo o coração de Deus e ter me dado apoio, cuidado, amor e dividir comigo as etapas dessa fase da minha vida.

Aos meus amigos de laboratório, Camila, Diana, Eduardo, Daniele, Érica, Irineo, Jéssica, Taize, Thiellen, Vanessa, por toda paciência, partilha e amorosidade compartilhada nesse período. Não se faz pós-graduação sozinha, e com vocês o processo foi especial!

Aos colegas do laboratório de nanotecnologia farmacêutica por todo apoio e incentivo.

Aos amigos e familiares que sempre permaneceram, muito obrigada!

Aos meus amigos do Movimento Universidades Renovadas por todo sustento em oração, e por terem me ensinado mais sobre o amor de Deus!

Ao meu orientador Najeh e a Professora Rubiana, por toda dedicação, ensinamentos e incentivo. Obrigada pela confiança!

Aos professores Adriana Knob, João Paulo Niemes e Christiane Schneider Machado Kolc pela disponibilidade durante a qualificação e auxílio durante a pesquisa.

Aos professores da pós-graduação, pelos ensinamentos. Todos os demais funcionários da Unicentro que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos técnicos e responsáveis pelo Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá e do Centro de Ciências Moleculares e Nanotecnologia da Unicentro (CCMN).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) pelo apoio ao presente trabalho- Código de financiamento 88882.464225/2019-01.

*“Porque ainda que a figueira não
floresça, nem haja fruto na vide; ainda que
decepção o produto da oliveira, e os
campos não produzam mantimento; ainda
que não haja ovelhas no aprisco, e nos
currais não haja gado;
Todavia eu me alegrarei no Senhor; exultarei
no Deus da minha salvação.
O Senhor Deus é a minha força, ele torna
meus pés ágeis com os da corça, e me faz
andar sobre os cimos” (Habacuc 3:17-19)*

*“O que ninguém nunca viu nem ouviu, e o que jamais
alguém pensou que podia acontecer, foi isso o que Deus
preparou para aqueles que o amam” (1 Coríntios 2:9)*

RESUMO

Introdução: a própolis é um produto natural com propriedade anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antioxidante e cicatrizante. Porém, assim como a maioria dos produtos naturais, apresenta baixa solubilidade em água e ampla degradação gastrointestinal, que dificultam a sua biodisponibilidade.

Objetivo: nesse sentido, no presente trabalho desenvolvemos uma nanoemulsão a base de lecitina e ácido oleico para o carregamento de extrato etanólico da própolis, a fim de melhorar suas características farmacocinéticas e potencializar suas atividades biológicas.

Metodologia: a nanoemulsão foi desenvolvida pelo método de homogeneização por alto cisalhamento. A eficiência de encapsulação foi determinada pelos compostos fenólicos totais e demais caracterizações físico-químicas e de estabilidade foram realizadas. A atividade antifúngica das nanopartículas foi avaliada frente a cepas de *Candida albicans* 0546 VITROIDSTM, e quatro cepas clínicas de *C. albicans*, *Candida glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* pelo método CLSI. E a toxicidade foi avaliada a partir do ensaio de hemólise *ex vivo*.

Resultados: as nanopartículas apresentaram diâmetro médio de $264,7 \pm 11,1$ nm, com índice de polidispersão de $0,247 \pm 0,039$ e potencial zeta de $-38,7 \pm 3,30$ mV, com eficiência de encapsulação de $93,32\% \pm 0,50$. A partir da microscopia eletrônica de varredura observou-se a presença de nanopartículas esféricas e lisas. A nanoemulsão permaneceu estável até 84 dias de avaliação em temperatura ambiente e refrigerada. Além disso, apresentou um perfil de liberação prolongada em fluídos gastrointestinais. Em relação à atividade antifúngica, as nanopartículas apresentaram resultados similares ao do extrato etanólico, sendo considerados promissores. No ensaio de hemólise *ex vivo*, as nanopartículas apresentaram hemólise apenas após 72 horas na maior concentração testada e com percentual inferior ao encontrado para o extrato etanólico da própolis, que apresentou hemólise em todos os intervalos de tempo e concentrações testadas.

Conclusão: com isso, pode-se sugerir que foi possível desenvolver um sistema de baixo custo e estável, com características físico-químicas adequadas e atividades biológicas *in vitro* potencializadas frente a cepas de *Candida* spp.

Palavras-Chave: Nanopartículas; Produtos Naturais; Antifúngico; Compostos fenólicos totais.

ABSTRACT

Introduction: Propolis is a natural product with anti-inflammatory, antitumor, antibacterial, antifungal, antioxidant and healing properties. However, like most natural products, it has low water solubility and extensive gastrointestinal degradation, which hinder its bioavailability.

Objective: in this sense, in the present work we have developed a nanoemulsion based on lecithin and oleic acid to carry ethanol extract of propolis, in order to improve its pharmacokinetic characteristics and enhance its biological activities.

Methodology: the nanoemulsion was developed using the high shear homogenization method. The encapsulation efficiency was determined by the total phenolic compounds and other physicochemical and stability characterizations were performed. The antifungal activity of the nanoparticles was evaluated against strains of *Candida albicans* 0546 VITROIDS™, and four clinical strains of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* though the CLSI method. And toxicity was assessed from the *ex vivo* hemolysis assay.

Results: the nanoparticles had an average diameter of 264.7 ± 11.1 , with a polydispersion index of 0.247 ± 0.039 and a zeta potential of -38.7 ± 3.30 mV, with an encapsulation efficiency of $93.32\% \pm 0.50$. From scanning electron microscopy, the presence of spherical and smooth nanoparticles was observed. The nanoemulsion remained stable until 84 days of evaluation. Regarding antifungal activity, nanoparticles showed results similar to ethanol extract, being considered promising. In the *ex vivo* hemolysis assay, the nanoparticles showed hemolysis only after 72 hours at the highest concentration tested and with a percentage below that found for the propolis ethanol extract, which presented hemolysis at every intervals and concentrations tested.

Conclusion: with this, it can be suggested that it was possible to develop a low-cost and stable system, with adequate physical-chemical characteristics and biological activity *in vitro* potentiated against *Candida* spp strains.

Keywords: Nanoparticles; Natural products; Antifungal; Total phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática de um sistema de nanoemulsão Óleo em Água (O/A) e Água em Óleo (A/O).	27
Figura 2- Obtenção de nanoemulsão de lecitina contendo EEP por homogeneização de alto cisalhamento.	36
Figura 3- Esquema de inóculo para avaliação da atividade antifúngica do EEP, NPC e NPV sobre cepas de <i>Candida</i> sp em meio RPMI.	41
Figura 4- Curva analítica do ácido gálico (10, 20, 40, 50 e 60 µg. mL ⁻¹) utilizada na determinação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.	46
Figura 5- Eletromicrografias das NP's de lecitina contendo EEP. Em que: A (400 nm) e B (500 nm).	49
Figura 6- Espectro FTIR de (A) EEP, (B) NPC, (C) NPV.	51
Figura 7- Perfil de liberação <i>in vitro</i> do EPP a partir das NPC's em FGS (pH 1,2) e FIS (pH 6,8), com Tween 80 1%, a 37 °C, sob agitação de 150 rpm.	53
Figura 8- Estabilidade das NP's sob diferentes condições de armazenamento em Temperatura Refrigerada (8 °C±4 °C) e Temperatura Ambiente (25 °C±5 °C) para o parâmetro diâmetro médio (A), índice de polidispersão (B) e potencial zeta (C).	54
Figura 9- Avaliação da atividade antifúngica das NPC em comparação com o EEP e NPV pela contagem das UFC's em cepa de (A) <i>C. albicans</i> 0546 VITROIDS TM , (B) <i>C. albicans</i> clínica e (C) <i>C. glabrata</i> clínica, leitura em 24 horas de incubação (n=3).	57
Figura 10- Avaliação da atividade antifúngica das NPC's em comparação com o EEP pela contagem das UFC's em cepa de (D) <i>C. parapsilosis</i> clínica e (E) <i>C. tropicalis</i> clínica, leitura em 24 horas de incubação (n=3).	58
Figura 11- Avaliação da citotoxicidade de EEP, NPC, NPV, além dos controles tampão e etanol sobre hemácias na concentração de e 50 µg. mL ⁻¹ (A), 200 µg. mL ⁻¹ (B) incubação de 24 h, 48 h e 72 h.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Principais sistemas nanoestruturados desenvolvidos para carreamento da própolis nos últimos 5 anos.	30
Tabela 2- Caracterização físico-química de NP's de EEP quanto a diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e percentual de eficiência de encapsulação (n=3).	44
Tabela 3- Potencial zeta observado na NPC e NPV e os componentes presentes na formulação da nanoemulsão (n=3).	45
Tabela 4- Solubilidade do EEP nos FGS e FIS, a 37 °C, 150 rpm, para ensaio de liberação, (n=3).....	52
Tabela 5- Concentração Inibitória Mínima em µg. mL ⁻¹ do EEP, NPC e NPV frente às cepas <i>C. albicans</i> 0546 VITROIDS™, <i>C. albicans</i> clínica, <i>C. glabrata</i> clínica, <i>C. tropicalis</i> clínica e <i>C. parapsilosis</i> clínica. Onde: N/O: Não observada.	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ANOVA	<i>Analyse of Variance</i> - Análise de variância
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
CAPE	Ácido Fenil Éster Cafeíco
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CN	Controle Negativo
COMCAP	Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa
CP	Controle Positivo
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> – Espalhamento Dinâmico da Luz
DM	Diâmetro Médio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DRX	Difração de Raios X
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EE%	Eficiência de Encapsulação
EEP	Extrato Etanólico de Própolis
FGS	Fluído Gástrico Simulado
FIS	Fluído Intestinal Simulado
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
IPD	Índice de Polidispersão
LC	mg de compostos fenólicos totais encapsulados
LTDA	Limitada
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NPC	Nanopartícula Carregada
NPV	Nanopartícula Vazia
NP's	Nanopartículas

PB	Tampão Fosfato de Potássio
PBS	Tampão Fosfato de Potássio Salinizado
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PNCQ	Programa Nacional de Controle de Qualidade
R ²	Coefficiente de correlação
Rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Meio para cultura de células tumorais
sp	Espécie
spp	Espécies
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro-Oeste
UV-Vis	Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Determinação da EE%.....	38
Equação 2- EEP cumulativo liberado das NPC's	39
Equação 3- Percentual de hemólise.....	43

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1.	Própolis	20
2.2.	Constituintes	20
2.3.	Própolis Marrom	21
2.4.	Propriedades Farmacológicas	22
2.4.1.	Propriedade Antioxidante	22
2.4.2.	Propriedade Anti-inflamatória	22
2.4.3.	Propriedade Anticâncer.....	23
2.4.4.	Propriedade Antimicrobiana	23
2.5.	Nanotecnologia.....	25
2.6.	Nanoemulsões.....	26
2.7.	Lecitina	28
2.8.	Ácido Oleico	29
2.9.	Nanopartículas contendo própolis	29
3.	OBJETIVOS	33
3.1.	Objetivo Geral	33
3.2.	Objetivos específicos.....	33
4.	MATERIAIS	34
4.1.	Equipamentos	34
4.2.	Reagentes.....	34
5.	METODOLOGIA.....	36
5.1.	Extrato Etanólico da Própolis	36
5.2.	Obtenção das Nanopartículas.....	36
5.3.	Diâmetro Médio (DM) e Índice de Polidispersão (IPD).....	37
5.4.	Potencial Zeta.....	37

5. 5.	Eficiência de Encapsulação (EE%).....	37
5. 6.	Análise Morfológica das Nanopartículas.....	38
5. 7.	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier.....	38
5. 8.	Estudo da liberação em fluido gastrointestinal in vitro	39
5. 8. 1.	Ensaio de solubilidade do EEP em Fluido Gástrico Simulado (FGS) e Fluido Intestinal Simulado (FIS)	39
5. 8. 2.	Liberação do EEP das NPC's em FGS e FIS.....	39
5. 9.	Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de Diluição em Caldo do CLSI	40
5. 9. 1.	Microrganismos	40
5. 9. 2.	Atividade Antifúngica pelo Método de Microdiluição em Caldo do CLSI.....	40
5. 10.	Avaliação da atividade citotóxica <i>ex vivo</i> em hemácias.....	42
5. 10. 1.	Preparação das Hemácias	42
5. 10. 2.	Atividade citotóxica <i>ex vivo</i> sobre hemácias	42
5. 11.	Estabilidade.....	43
5. 12.	Análise Estatística.....	43
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6. 1.	Diâmetro Médio e Índice de Poldispersão.....	44
6. 2.	Potencial Zeta.....	45
6. 3.	EE%	46
6. 4.	Análise Morfológica das Nanopartículas.....	48
6. 5.	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	50
6. 6.	Estudo da liberação em fluido gastrointestinal in vitro	52
6. 6. 1.	Ensaio de solubilidade do EEP em FGS e FIS	52
6. 6. 2.	Liberação do EEP das NPC's em FGS e FIS.....	52
6. 7.	Estabilidade.....	54
6. 8.	Avaliação da Atividade Antifúngica	56
6. 9.	Avaliação da citotoxicidade das NP's contendo EEP sobre hemácias.....	60
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62

8.	CONCLUSÃO.....	63
9.	REFERÊNCIAS	64
10.	ANEXO 1.....	81
11.	ANEXO 2.....	82

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são amplamente estudados no desenvolvimento de novas terapias contra doenças graves e emergentes. O aumento do número de casos de doenças negligenciadas e da resistência a antimicrobianos é um importante estímulo à busca de novas estratégias terapêuticas nesse sentido (DOTA et al., 2011; FRANCHIN et al., 2016; FRANCISCO et al., 2017; AFROUZAN et al., 2018). Entre esses produtos, a própolis tem apresentado propriedades e biológicas em diversos estudos, sendo considerada uma alternativa para doenças infecciosas e não infecciosas (GUIMARÃES et al., 2012; MACHADO et al., 2012; BRYAN et al., 2015; ADOMAVICIUTE et al., 2016; BALTAS et al., 2016; DRIGLA et al., 2016; FREIRES et al., 2016; AL-ANI et al., 2018; ASKARI et al., 2018).

A própolis é uma resina natural composta por enzimas, pólen e ceras, além de óleos essenciais e outras substâncias orgânicas. Utilizadas em maior quantidade por abelhas da espécie *Apis mellífera*, para construção, reparo e proteção das colmeias devido a sua resistência mecânica e atividade biológica que protegem as colmeias contra invasores, o calor, a umidade e o vento (AVANÇO et al., 2008; AGÜERO et al., 2014; CHEN et al., 2017; ESCRICHE & JUAN-BORRÁS, 2018).

Apesar de ser utilizada de maneira popular há muito tempo em formulações cosméticas e farmacêuticas, e de suas atividades farmacológicas ativas, o uso da própolis na prática clínica ainda apresenta algumas dificuldades (FOKT et al., 2010; ANJUM et al., 2018; SANTOS et al., 2019). Entre elas, a baixa solubilidade em água, a degradação no trato gastrointestinal, baixa biodisponibilidade e a variação de seus componentes, decorrentes das condições ambientais, de coleta e extração (PUGLIA et al., 2017; ZHANG et al., 2018). De modo geral, essas limitações são comuns na administração de produtos naturais. Além disso, apesar dos inúmeros esforços, a falta de padronização nos estudos e testes *in vivo* dificulta o desenvolvimento de medicamentos a partir da própolis (ONG et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

A nanotecnologia tem sido empregada a fim de melhorar as condições farmacocinéticas e farmacodinâmicas da própolis, desde micelas até formulações proteicas e micropartículas (GATEA et al., 2015; ELBAZ et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2016; DEL-CARPIO-PEROCHENA et al., 2017). No desenvolvimento de NP's para o carreamento de produtos naturais, torna-se importante definir um transportador

que seja biocompatível e biodegradável, de maneira a aumentar a biodisponibilidade destes produtos (ONG et al., 2017).

Nesse sentido, as nanoemulsões são sistemas de dispersão de dois líquidos imiscíveis: gotículas de água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou múltiplas (A/O/A) estabilizadas por um surfactante anfifílico. Elas são apropriadas para o carreamento de compostos pouco solúveis em água (ODRIOZOLA-SERRANO et al., 2014), além de incluir proteção frente processos enzimáticos e oxidativos (YUKUYAMA et al., 2017). Permitem a utilização de algumas vias de administração como a oral (HU et al., 2019), tópica (RAI et al., 2018), parenteral (TAN et al., 2015; HARUN et al., 2018), intranasal (BOCHE & POKHARKAR, 2017; AHMAD et al., 2018), ocular (SHAH et al., 2019) e pulmonar (ARBAIN et al., 2019).

A lecitina é um dos surfactantes mais comumente utilizados no desenvolvimento das nanoemulsões (VATER et al., 2019). Por ser uma mistura de fosfolipídeos com característica anfifílica, com origem no leite, gema de ovo, e oleoginosas como soja e grãos de girassol, é considerada segura e não-tóxica (CHEN & INBARAJ, 2019). A lecitina forma uma barreira mecânica ao redor das gotas de óleo da emulsão, o que auxilia na estabilidade do sistema (KLANG & VALENTA, 2011).

O ácido oleico tem associação com diversas funções fisiológicas que trazem benefícios a doenças como câncer, autoimunes, inflamatórias e cicatrização de feridas e tem sido utilizado na formulação de sistemas nanoestruturados (SALES-CAMPOS et al., 2013).

Nesse estudo, desenvolveu-se uma nanoemulsão a partir de lecitina e ácido oleico contendo extrato etanólico de própolis (EEP), ambos os produtos com características biocompatíveis e biodegradáveis, a fim de oferecer um produto de uso seguro e com melhores características farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Própolis

A própolis tem sido utilizada desde muito tempo em diversas aplicações ao longo da história. Há relatos do seu uso pelos egípcios para o embalsamento de cadáveres e como desinfetante e antisséptico na Grécia (RASSU et al., 2015).

É amplamente comercializada como produto natural de uso tópico e com aplicações em infecções do trato respiratório superior, preparações dermatológicas para a cicatrização de feridas, tratamento de queimaduras, acne, herpes simples e genitais e neurodermatites. Além disso, a própolis é utilizada em diversos cosméticos, produtos de higiene, alimentos e bebidas (WAGH, 2013; AFROUZAN et al., 2018).

No Brasil os tipos mais frequentemente encontradas são a própolis verde oriunda da *Baccharis dracunculifolia* DC., própolis marrom da *Copaifera* spp. e a própolis vermelha da *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (DEVEQUI-NUNES, 2018).

2.2. Constituintes

A composição química da própolis sofre influência de diferentes fatores, desde a localização da planta em que as abelhas coletaram o pólen, até as características genéticas das abelhas coletoras (ABREU, 2008). Fatores geográficos interferem com uma maior expressão sobre a composição química da própolis. Portanto, as determinações da origem geográfica e inclusive vegetal se tornam fundamentais para estabelecer quais são os componentes responsáveis pelas atividades biológicas e sua possível utilização como alternativa terapêutica (MIGUEL et al., 2010; BARTH et al., 2013; ELBAZ et al., 2016; AL-ANI et al., 2018).

Devido a sua grande diversidade de compostos fenólicos, a própolis pode receber uma classificação de acordo com sua coloração, que pode variar de vermelho, verde e marrom (BITTENCOURT et al., 2015). É composta por aproximadamente 500 componentes químicos, entre substâncias lipofílicas, como resinas e balsamos, látex de planta e cola vegetal, além de substâncias polifenólicas, alcaloides, ácidos aromáticos e seus ésteres, flavonoides, cetonas e terpenos, e ainda alguns minerais e vitaminas, ácidos graxos e enzimas, fenilpropanoides, terpenoides, estilbenos, lignanas, cumarinas

e derivados prenilados (CORNARA et al., 2017); (NASCIMENTO et al., 2016; AFROUZAN et al., 2018; KLARIC et al., 2018).

Entre estes, os principais componentes com atividades biológicas relatadas são os ácidos fenólicos, ésteres de ácido fenólico, flavonoides e terpenoides como o artepillin C, ácido cafeico (CAPE), crisina, quercetina e galangina, apigenina, pinocembrina, ácido isoferúlico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e kaempferol (HUANG et al., 2014).

2.3.Própolis Marrom

Como mencionado anteriormente, os diferentes tipos de compostos variam de acordo com condições relacionadas à coleta da planta, método de extração dos compostos e região geográfica de origem (MIGUEL et al., 2010; BARTH et al., 2013; ELBAZ et al., 2016; AL-ANI et al., 2018).

No estudo de Waller e colaboradores (2017) analisando amostras brasileiras de extrato hidroalcolico de própolis da região Sul, os compostos mais prevalentes foram ácido-p-cumárico, rutina, ácido clorogênico, ácido ferúlico e ácido cafeico. Perfil comum em outros estudos com a própolis marrom, em que os compostos fenólicos são abundantes.

Um estudo desenvolvido por Rodrigues et al (2016), na região de Prudentópolis, no Paraná, região de origem do extrato etanólico utilizado em nosso estudo. Apesar dos compostos fenólicos serem abundantes na amostra de própolis marrom, não foram mais prevalentes que na própolis verde. E o composto mais prevalente foi o Artepillin C, responsável por diversas atividades biológicas da própolis (DEEGAN et al., 2019).

Em outro estudo conduzido com própolis marrom da região de Prudentópolis, foram identificados alguns compostos com maior prevalência, entre eles: Artepillin C; Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico; diidrokaempferida, isosakuranetina, kaempferida (CARVALHO et al., 2011).

2.4. Propriedades Farmacológicas

2. 4. 1. Propriedade Antioxidante

Os antioxidantes têm a capacidade de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que eles tenham atividade tóxica nos componentes celulares. São substâncias que quando presentes em baixas concentrações retardam ou inibem a oxidação do substrato. Quanto maior o número de hidroxilas presentes na estrutura do composto maior será sua atividade antioxidante (SANTOS et al., 2017; TAPIA-HERNÁNDEZ et al., 2018).

Além disso, o estresse oxidativo a biomoléculas por radicais livres pode levar a danos celulares no fígado, rins, contribuir com o processo de envelhecimento, carcinogênese, desordens imunológicas e aterogênese (GUIMARÃES et al., 2012; ALMANSOUR et al., 2016). A propriedade antioxidante da própolis é uma característica importante no tratamento de diversas doenças oriundas de processos inflamatórios (ABREU, 2008; MACHADO et al., 2012).

No estudo de Guimarães e colaboradores (2012), avaliando o potencial antioxidante da própolis verde coletada da *B. dracunculifolia* e sua capacidade de prevenção de dano oxidativo às mitocôndrias, a propriedade antioxidante foi relacionada aos compostos fenólicos e aos flavonoides presentes no extrato. Os compostos fenólicos atuaram como doadores de hidrogênio capazes de reagir com o CO_2 e os flavonoides como inibidores da reação de oxidação em cadeia dos lipídeos.

2. 4. 2. Propriedade Anti-inflamatória

A própolis pode ocasionar a diminuição no processo inflamatório em processos de cicatrização, lesões em mucosa exposta e na presença de exsudatos (ROSSETO et al., 2017). No estudo de Adomaviciute e colaboradores (2016) a atividade cicatrizante observada foi justificada pelo estímulo da liberação dos compostos fenólicos presentes nas NP's de prata produzidas com o extrato da própolis.

No trabalho de Askari e colaboradores (2018), a atividade anti-inflamatória da própolis no tratamento dose dependente da adesão peritoneal pós-cirúrgica foi observada como agente protetor. Enquanto que os resultados encontrados no estudo de Machado e colaboradores (2012) em modelo animal demonstraram potencial anti-inflamatório aditivo ou sinérgico para diminuição da reação inflamatória observada. A

atividade do extrato foi capaz de modular a produção das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, prevenindo uma amplificação do processo inflamatório.

Franchin e colaboradores (2016) observaram atividade inibitória na migração de neutrófilos com o vestitol, isoflavonoide isolado da própolis. Sua atividade está relacionada à diminuição da liberação de citocinas por macrófagos e diminuição do rolamento e adesão dos leucócitos na microcirculação mesentérica. Além disso, o estudo observou diminuição da quimiotaxia através do bloqueio do influxo de cálcio.

2. 4. 3. Propriedade Anticâncer

Alguns mecanismos de ação são propostos para a propriedade anticancerígena da própolis, como a inibição da matriz de metaloproteínas, atividade anti-angiogênese, parada do ciclo celular, indução de apoptose e prevenção da metástase (ELBAZ et al., 2016).

Entre os compostos com atividade biológica, o CAPE tem sido frequentemente utilizado nos ensaios de atividade anticancerígena. E tem apresentado atividade inibitória ou de bloqueio em diferentes estudos *in vivo* e *in vitro* realizados com linhagens celulares distintas de câncer de próstata, cérebro, rim, estômago e mama, entre outros (LIN et al., 2012; AKYOL et al., 2013).

No estudo de Omene e colaboradores (2014), o CAPE atuou como inibidor da histona desacetilase – que modula a atividade de oncogenes e genes supressores de tumor no câncer de mama. E, em sinergismo com a própolis, essa regulação foi positiva no oncogene diante das linhagens celulares testadas.

Além disso, testes de citotoxicidade vêm sendo realizados em diferentes sistemas, com a própolis apresentando resultados seguros (KAZEMI et al., 2017), sugerindo ser esta um produto natural seguro a longo prazo e um agente epigenético disponível com grande potencial contra câncer de mama e outros tipos de câncer.

2. 4. 4. Propriedade Antimicrobiana

Nas últimas décadas, tem-se observado relato de cepas bacterianas com perfil de resistência aos antimicrobianos disponíveis atualmente na prática clínica, o que se torna

um problema econômico e de saúde pública, principalmente em pacientes imunocomprometidos e que estão em ambiente hospitalar (YANG et al., 2018).

A característica de distribuição da resistência farmacológica em uma população bacteriana se relaciona com o modo de transmissão, colonização e a patogenicidade dos organismos, além das bases genéticas, mecanismos intrínsecos e mutações associadas (BAKER et al., 2017; VIMBELA et al., 2017). Frente a isso, estudos de novas alternativas terapêuticas com atividade antibacteriana tem extrema relevância e demanda econômica e social (MEMAR et al., 2018; TONE et al., 2018).

Além disso, as infecções fúngicas são cada vez mais frequentes ao redor do mundo, e estão associadas ao aumento de morbidade e mortalidade, especialmente em ambiente hospitalar (WALLER et al., 2017; SUN et al., 2018). Existem basicamente quatro classes de antifúngicos, os azóis, polienos, equinocandinas e alilaminas (ARMSTRONG & TAYLOR, 2009), o que torna a oferta terapêutica muito restrita, possibilitando o surgimento de cepas resistentes e o comprometimento terapêutico do indivíduo, principalmente por serem classes que envolvem drogas com um nível de citotoxicidade e restrições nas vias de administração (SZWEDA et al., 2015).

A atividade antibacteriana da própolis já foi observada em diversos ensaios e apresenta variações de acordo com o método de preparo do extrato, meios empregados, microrganismos testados e métodos de avaliação da atividade (TORLAK et al., 2013; DENISOW & DENIZOW-PIETRZYK, 2016).

Em 1994, no estudo de Takaisi-Kikuni & Schilcher com microscopia eletrônica, foi possível observar que a ação da própolis desorganiza o citoplasma das células bacterianas, interferindo na divisão celular e na síntese de proteínas.

No estudo de Al-ani e colaboradores (2018) a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos hídrico e etanólico da própolis apresentou atividade bacteriostática, ou seja, inibiu o crescimento dos microrganismos testados, sendo atribuída ao efeito sinérgico dos diferentes compostos presente nos extratos. Houve, ainda, diferença entre a atividade frente às cepas Gram positivas e Gram negativas, uma vez que as Gram positivas tiveram baixa sensibilidade aos extratos.

Esse comportamento da própolis em cepas Gram positivas e negativas também foi observado no estudo de Silva e colaboradores (2017), porém as cepas Gram positivas foram mais sensíveis ao extrato, fato comum a estudos anteriores (GRANGE & DAVEY, 1990; BOONSAI et al., 2014). A justificativa para tal comportamento se relaciona com a composição química da parede celular das Gram positivas e Gram

negativas, além das variações nas concentrações testadas e do método de extração dos extratos (AL-ANI et al., 2018).

No estudo de Waller e colaboradores (2017), o extrato hidroalcoólico da própolis apresentou resultados de inibição do *Sporothrix brasiliensis*, causador da esporotricose animal, inclusive em cepas que eram resistentes a itraconazol. Outro resultado interessante, em cepas com resistência, foi encontrado no estudo de Sun e colaboradores (2018), em que houve efeito sinérgico entre o éster fenético de CAPE um importante componente ativo da própolis juntamente com o fluconazol sob cepas de *C. albicans* com resistência para o fluconazol, nos ensaios utilizando o CAPE e o fluconazol obteve-se os melhores resultados na diminuição do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/mL.

Um dos problemas enfrentados na preparação dos extratos da própolis com atividade antifúngica é a concentração do composto etanólico. A alta concentração dificulta a administração e a estabilidade da droga. Uma alternativa tem sido utilizar concentrações menores do composto e manter a própolis encapsulada em NP's e micropartículas, obtendo liberação prolongada da própolis com atividade antimicrobiana (DOTA et al., 2011; ADOMAVICIUTE et al., 2016).

2.5.Nanotecnologia

Nanopartículas (NP's) são estruturas ordenadas na faixa de 1 a 1000 nm (KELLY et al., 2019). Entre os sistemas desenvolvidos estão as NP's a base de polímeros, polissacarídeos, proteínas, micelas, dendrímeros (PARVEEN; MISRA & SAHOO, 2012), lipídios (SILVA et al., 2015), lipossomas, NP's inorgânicas e nanocristais (PATRA et al., 2018).

São usadas para transportar e liberar drogas bioativas (BERHET et al., 2017). Sua interação com os tecidos biológicos sofre influência da morfologia, estrutura físico-química e eletrônica, além do processo de obtenção (RALIYA et al., 2016).

Alguns dos maiores desafios no aperfeiçoamento de terapias para uma variedade de doenças humanas é o carreamento e a liberação eficiente de fármacos a alvos específicos (ELBAZ et al., 2016; ONG et al., 2017). Nesse sentido, os sistemas nanoestruturados são promissores no aumento da eficácia dos fármacos, pois podem ultrapassar múltiplas barreiras biológicas e otimizar a liberação do fármaco, além de

possibilitar o direcionamento a alvos específicos e proteção contra a inativação e eliminação prematura dos fármacos (PANDEY et al., 2005; ROY et al., 2010; HUBBS et al., 2013; YAN et al., 2014).

As NP's permitem ainda uma terapia de liberação controlada e sustentada (KAZEMI et al., 2017). O fármaco liberado desses sistemas no local desejado apresenta eficácia terapêutica favorável quando comparado aos medicamentos convencionais, pois as nanoestruturas protegem os fármacos da degradação enzimática, modulando sua farmacocinética (COSTA et al., 2018). Ainda podem atuar na diminuição dos efeitos colaterais, melhorar a solubilidade aquosa de moléculas e permitir melhor penetração tecidual (KALEPU & NEKKANT, 2016; SOLIMAN, 2017).

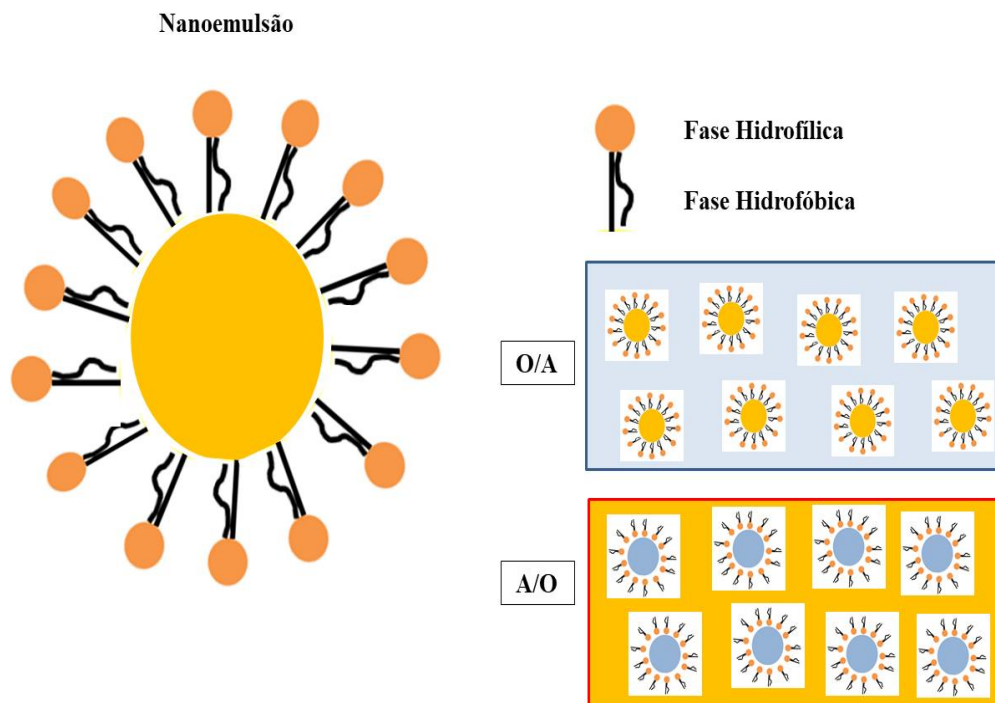
Polímeros naturais são mais promissores para o desenvolvimento de NP's por conta da sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de apresentarem baixa toxicidade (ONG et al., 2017). E em aplicações farmacêuticas têm um potencial de aumentar e prolongar o tempo de ação e absorção nos sítios de interesse, e também no epitélio intestinal, onde diminui a interação das junções de membrana facilitando a absorção (PENICHE & PENICHE, 2011).

2.6. Nanoemulsões

São sistemas de dispersão de dois líquidos imiscíveis de água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou múltiplos (A/O/A) estabilizados por um surfactante anfifílico (Figura 1) (SINGH et al., 2017). Normalmente encontram-se na faixa de 20-200 nm (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015). Tem sido amplamente utilizados na administração de medicamentos, alimentos, cosméticos e síntese de materiais (GUPTA et al., 2016; KAUR et al., 2017; PATHAKOTI; MANUBOLU & HWANG, 2017).

Um parâmetro importante para nanoemulsões é a estabilidade termodinâmica do sistema e a capacidade de encapsular compostos hidrofílicos e hidrofóbicos (YUKUYAMA et al., 2016; PANDEY et al., 2018; ALI et al., 2017). Os processos de produção dessas NP's também facilitam o escalonamento e a aplicação industrial (MA; LI & GUAN, 2015).

Figura 1- Representação esquemática de um sistema de nanoemulsão Óleo em Água (O/A) e Água em Óleo (A/O).



Em que: O/A- óleo em água e A/O- água em óleo.

Especialmente para a via de administração oral, as nanoemulsões são interessantes por aumentarem a solubilidade dos compostos lipofílicos e conseqüentemente sua biodisponibilidade (MCCLEMENTS, 2013; ZHANG et al., 2013; CHOUDHURY et al., 2017). A liberação sustentada pode estar associada à forma de liberação da droga da nanoemulsão a partir da difusão na fase oleosa, partição do óleo na camada surfactante e posteriormente na fase aquosa. Além disso, relatos de retenção na mucosa gástrica, absorção linfática e transporte direto favorecem a liberação controlada (SINGH et al., 2017).

Outra característica importante nas nanoemulsões é a utilização de ingredientes biocompatíveis e biodegradáveis, reduzindo os efeitos colaterais do composto encapsulado (GANTA et al., 2014; HÖRMANN & ZIMMER, 2016; ALAM et al., 2017; SOSA et al., 2017; REHMAN et al., 2017).

As nanoemulsões podem ser produzidas por métodos de alta energia como a homogeneização de alta pressão, microfluidização, sonicação, dispersão a jato e

ultrassonicação (MODARRES-GHEISARI et al., 2019). Ou ainda, métodos de baixa energia como a emulsificação espontânea, inversão de fase e, temperatura de inversão de fase (PERAZZO et al., 2015; ANTON et al., 2008). A escolha do método está diretamente relacionada ao tamanho das NP's, taxa de adsorção do surfactante e tensão superficial (JASMINA et al., 2017).

As aplicações destes sistemas na área farmacêutica são múltiplas, com encapsulação de compostos com atividade anticâncer (PERIASAMY; ATHINARAYANAN; ALSHATWI, 2016; ALKHATIB; ALSHEHRI; ABDU, 2018), antimicrobiana (THAKKAR et al., 2015; LOU et al., 2019), antioxidante (AHMAD et al., 2017; RINALDI et al., 2017), cicatrizante (SHANMUGAPRIYA et al., 2018), anti-inflamatória (GHIASI et al., 2019) com resultados promissores de aplicação terapêutica.

2.7.Lecitina

De modo geral, os fosfolipídeos apresentam características importantes como a biocompatibilidade e a anfifilicidade, as quais permitem sua utilização na administração de medicamentos (LI et al., 2015). A lecitina, por ser um surfactante de ocorrência natural, amplamente utilizado na indústria de alimentos é uma alternativa segura e de baixo custo para o preparo de NP's (MICHAL; EWA & TOMASZ, 2015; DAI et al., 2016).

Tem sido relatada como surfactante em aplicações farmacêuticas principalmente por proporcionar estabilidade aos sistemas, impedindo fenômenos de agregação, floculação, precipitação, entre outros (CHEN et al., 2016; SAPORITO et al., 2017).

Além disso, sendo a lecitina um tipo de fosfolipídeo, composto principalmente de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, auxilia na manutenção da fluidez da membrana celular, além de facilitar a absorção e solubilidade de moléculas (HAFNER et al., 2011; JIN et al., 2013). A lecitina ainda pode aumentar a solubilização das moléculas, tanto hidrofílicas como hidrofóbicas (MOURI et al., 2014; CHEN et al., 2016).

Sistemas de administração de diferentes vias tem sido desenvolvidos com NP's de lecitina, entre eles via oral (JAVED et al., 2016; LIU et al., 2016), tópica (SENYIGIT et al., 2016; QAYOOM et al., 2019), intravenosa (YANASARN; SLOAT & CUI, 2009), nasal (DUKOVSKI et al., 2017), e ocular (CHHONKER et al., 2015), os

quais são promissores por aumentarem a estabilidade, biodisponibilidade e reduzir os efeitos tóxicos através destas vias de administração.

2.8.Ácido Oleico

O ácido oleico também vem sendo utilizado nestes sistemas, sendo um ácido graxo insaturado de cadeia longa, classificado como ômega-9 (GALÁN-ARRIERO et al., 2017). Possui diversas atividades biológicas relatadas, além de servir como fonte de energia, participa de funções metabólicas e estruturais (FAYEZI et al., 2018). Entre elas, a principal está relacionada à capacidade de perturbar a estrutura da membrana plasmática das células, e ainda a atividade bactericida, fragmentação do DNA, anti-inflamatória entre outras (CARRILLO et al., 2012; FONTANA et al., 2013). A formação de vesículas por esse tipo de ácido graxo permite que sejam utilizados em nanoemulsões, assegurando uma liberação mais prolongada do fármaco (VERMA et al., 2014).

2.9.Nanopartículas contendo própolis

Alguns sistemas nanoestruturados já foram desenvolvidos com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade e efeito terapêutico da própolis de diferentes locais e de composição distinta. Entre esses sistemas podemos citar NP's poliméricas, proteicas, lipídicas e algumas emulsões (Tabela 1).

Apesar dos esforços para o desenvolvimento de NP's para o carreamento da própolis, as variações na constituição e padronização dos experimentos ainda apresenta uma demanda. Principalmente associado à avaliação da toxicidade e eficácia desses sistemas. Como observamos, polímeros sintéticos tem sido utilizados nas formulações, e apesar das vantagens no sistema, o custo ainda é elevado.

Diante desse contexto, podemos ressaltar que a nanoemulsão desenvolvida em nosso estudo tem um caráter inovador. Utilizando componentes biocompatíveis e biodegradáveis para garantir a segurança no uso terapêutico da nanoemulsão. Além da formulação utilizar um método de baixo custo e alto rendimento na produção das NP's.

Tabela 1- Principais sistemas nanoestruturados desenvolvidos para carreamento da própolis nos últimos 5 anos.

Composição	Método de Obtenção	Eficácia	Toxicidade	Referência
PLGA e extrato etanólico de própolis vermelha	Emulsificação e difusão de solvente	NP's com diâmetro médio de 42,4 nm e eficiência de encapsulação de 96,9%. Apresentou potencial antimicrobiano com CIM de 15,6 a 125 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com inibição de formação de biofilme contra bactérias gram positivas e gram negativas.	-	Silva et al., 2020
PLGA e extrato etanólico de própolis	Emulsificação do solvente	NP's com diâmetro médio de 500 nm, índice de polidispersão de 0,36 e 0,57, potencial zeta de -1,2 e -3,9, e eficiência aproximada de 90%. Apresentou atividade inibitória em <i>Candida albicans</i> em relação à colonização, germinação, formação de biofilme e invasão.	Não foi observado inibição de crescimento em células Vero.	Iadnut et al., 2019
Óxido de zinco e extrato etanólico de própolis	Ultrassonicação	Formou-se um filme biodegradável de celulose bacteriana. CIM menor que 0,438 mg. mL^{-1} com possível efeito sinérgico em <i>C. albicans</i> e <i>Bacillus subtilis</i> . <i>Escherichia coli</i> não sofreu efeito sinérgico.	-	Mocanu et al., 2019
PLGA e extrato etanólico de própolis	Nanoprecipitação	Nanopartícula com eficiência de encapsulação de aproximadamente 80% e liberação prolongada. Além disso observou-se atividade antimicrobiana frente a <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> e <i>C. albicans</i>	Observou-se viabilidade celular em linhagens de WI-38 de fibroblastos normais humanos.	Abdel-Raheem et al., 2019

Nanopartícula de prata e extrato etanólico de própolis	Biossíntese	Atividade antimicrobiana frente a bactérias gram positivas como <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> . Observou-se estímulo da proliferação celular em fibroblastos estimulando a cicatrização.	Biocompatibilidade em fibroblastos 3T3	Baygar, 2019
Nanopartícula de prata e extrato etanólico de própolis	Biossíntese	NP's com diâmetro médio de 109 nm e índice de polidispersão menor que 0,3. Efeito antimicrobiano sinérgico com CIM de 4,162 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em <i>S. aureus</i> , 8, 325 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em <i>Staphylococcus epidermidis</i> , 16, 650 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em <i>P. aeruginosa</i> e atividade antifúngica em <i>C. albicans</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i> com CIM de 41 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e 832 $\mu\text{g. mL}^{-1}$.	-	Barbosa et al., 2019
Quitosana e extrato etanólico de própolis	Gelificação Ionotrópica	Inibição da germinação de esporos e da produção de aflatoxina de <i>Aspergillus flavus</i> .	-	Cortés-Higareda et al., 2019
Zeína, caseína, alginato e própolis	Precipitação de antisolvente	Diâmetro médio de 208 nm, potencial zeta -27 mV e eficiência de encapsulação de 86,5%.	-	Zhang et al., 2019
Polaxamer 188	Ultrassonicação	Foram preparadas NP's sólidas lipídicas e transportadores lipídicos transportadores para administração tópica de própolis que permitiu aceleração do processo de cicatrização em feridas <i>in vivo</i> .	Boa viabilidade celular em queratinócitos.	Rosseto et al., 2017

Quitosana e própolis	Gelificação Ionotrópica	Inibição do biofilme de <i>E. faecalis</i> em até 90% na concentração de 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$	-	Ong et al., 2017
Carboximetilcelulose, tween 80	Homogeneização de alta pressão	Diâmetro médio de 600 nm, índice de polidispersão de 0,4. NP's viáveis para administração nasal.	-	Rassu et al., 2015
Quitosana e própolis	Emulsão por evaporação do solvente	Aumento da atividade anticâncer em linhagens de células HepG2 e HCT 116, câncer de fígado e colorretal, respectivamente. Com aumento da eficácia terapêutica em até 3 x em HepG2 com indução de apoptose.	-	Elbaz et al., 2016
poli- ϵ -caprolactona e plurônico, extrato etanólico de própolis vermelha	Nanoprecipitação	Nanopartículas com diâmetro médio de 200-280 nm, e potencial zeta de -20 a -26 mV. Apresentou atividade citotóxica em <i>Leishmania (V) braziliensis</i> .	-	Nascimento et al., 2016

Entre as emulsões estudadas o principal objetivo é colaborar com sistemas estáveis para liberação da própolis em diferentes preparações do extrato, sendo hidroalcolico e etanólico (FAN et al., 2014; EL-GUENDOZ et al., 2018).

No estudo de Seibert e colaboradores (2019), o potencial antimicrobiano e antioxidante do extrato da própolis foi explorado numa nanoemulsão desenvolvida por emulsificação por inversão de fase com óleo de milho e tween 80, e os resultados mostraram a capacidade de conservação de alimentos.

Outro estudo com nanoemulsão foi desenvolvida por Butnariu & Giuchici (2011), com extrato aquoso de própolis e licopeno com mecanismo protetor na pele contra radiação ultravioleta, apresentando melhores efeitos terapêuticos com liberação controlada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão de lecitina contendo EEP por homogeneização de alto cisalhamento, bem como, avaliar algumas atividades biológicas específicas do sistema de nanoemulsão desenvolvido.

3.2. Objetivos específicos

- Obter nanoemulsão por homogeneização de alta pressão.
- Caracterizar as NP's quanto ao diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta.
- Determinar a eficiência de encapsulação (EE%) do EEP na nanopartícula, desenvolvida por meio da quantificação de compostos fenólicos.
- Avaliar a morfologia das NP's por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- Caracterizar as NP's quanto à composição química por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).
- Determinar o perfil de liberação *in vitro* em fluido gastrointestinal simulado.
- Avaliar a estabilidade da nanoemulsão em Temperatura Refrigerada ($8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) e Temperatura Ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) em 28, 56 e 84 dias após o armazenamento.
- Avaliar a atividade antifúngica da nanopartícula contendo EEP pelo método descrito no CLSI frente a cepas de *Candida* spp.
- Avaliar o perfil citotóxico frente a hemácias através do ensaio de hemólise *ex vivo*.

4. MATERIAIS

4.1. Equipamentos

- Autoclave vertical AV Plus (Phoenix®)
- Balança analítica (Tecnal M214A®)
- Câmara de fluxo laminar Bio Seg 09 (Veco®)
- Centrífuga para hematócrito Spin 1000 (Micro Spin®)
- Centrífuga refrigerada CT-15000R (Cientec®)
- Destilador de água (Cristófoli®)
- Equipamento para análise do potencial zeta – ZetaSizer ZS (Malvern®)
- Equipamento para medida do espalhamento dinâmico da luz - Dynamic LightScattering (Brookhaven Instruments Corp, *BIC 90 plus*®)
- Espectrofotômetro com leitor de placas (Flex Station 3- Molecular Devices®)
- Espectrofotômetro V-630 Bio (Jasco®)
- Estufa Bacteriológica (Quimis LPM2-20®)
- Homogeneizador de alto cisalhamento (Ultrasonique®)
- Incubadora com agitação orbital (Quimis®)
- Infravermelho Perkin Elmer (Spectrum®)
- Liofilizador Série LT (Terroni®)
- Macro-centrífuga (Benfer®)
- Micro-ondas (Electrolux®)
- Microscópio Eletrônico de Varredura Scios (FEI®)
- Placa de agitação magnética (Biomixer, 78 HW-I®)
- Refrigerador (Continental®)
- Sistema de ultrapurificação de água (MilliQ Gradiente Millipore®)

4.2. Reagentes

- Ácido gálico (Vetec®)
- Ácido oleico (Synth®)

- Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (Sigma-Aldrich®)
- Ágar Müller Hinton (Himedia®)
- Ágar sabouroaud dextrose (Fluka Analytical®)
- Água ultrapura (Milli-Q Gradiente Millipore®)
- Álcool etílico absoluto 99,8% (Neon®)
- Anfotericina B (Sigma-Aldrich®)
- Caldo Müller Hinton (Himedia®)
- Carbonato de cálcio (Biotec®)
- Cloreto de potássio (Química Moderna®)
- Cloreto de sódio P.A (Biotec®)
- Estreptomicina (Sigma-Aldrich®)
- Extrato etanólico de própolis (Colmeia Real®)
- Fosfato de potássio dibásico (Química Moderna®)
- Fosfato de potássio monobásico (Química Moderna®)
- Glicose anidra (Biotec®)
- Hidróxido de Sódio (Biotec®)
- L- α -fosfatidilcolina (Lecitina) (Sigma-Aldrich®)
- Meio Dmem/Mistura Nutriente Ham-F12 (L-glutamina) (Sigma-Aldrich®)
- Pancreatina (Sigma-Aldrich®)
- Penicilina G (Sigma-Aldrich®)
- Pepsina (Sigma-Aldrich®)
- Reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®)
- RPMI 1360 (Sigma-Aldrich®)
- Tubo EDTA (Vacuette®)

5. METODOLOGIA

5.1. Extrato Etanólico da Própolis

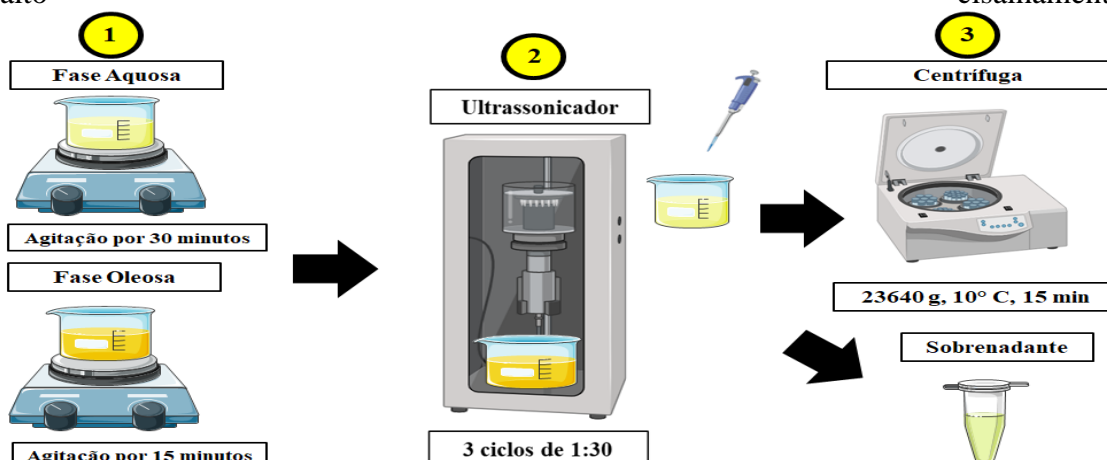
O EEP marrom foi adquirido na indústria Entrepasto de Mel e Cera de Abelhas Grande & Schmidt Ltda da região de Prudentópolis, Paraná.

5.2. Obtenção das Nanopartículas

As NP's foram preparadas a partir da ultrassonicação em um homogeneizador de alto cisalhamento, utilizando a lecitina como surfactante (Figura 2). A lecitina foi preparada em água na concentração de 1% (m/v) permanecendo em agitação magnética a 600 rpm por 30 minutos. Em seguida, 1 mL do extrato etanólico de própolis foi disperso em 0,1 g de ácido oleico (v/v) permanecendo sob agitação magnética 500 rpm por 15 minutos. Posteriormente, a fase aquosa foi gotejada na fase oleosa de maneira uniforme durante o processo de homogeneização por alto cisalhamento através de um ultrassonicador, em três ciclos de 1:30 minutos na potência de 90 W. A nanoemulsão foi formada e mantida em eppendorfs a 8 °C e 25 °C durante todo o período de armazenamento.

Para avaliação da eficiência de encapsulação, a nanoemulsão foi levada a centrifugação a 23640 g 10 °C por 15 minutos e o sobrenadante foi reservado. As NP's foram ressuspensas em um volume de 1000 µL de água ultrapura MiliQ.

Figura 2- Obtenção de nanoemulsão de lecitina contendo EEP por homogeneização de alto cisalhamento.



Em 1: processo de agitação das fases aquosa (lecitina/água) e oleosa (ácido oleico/EEP), 2: Homogeneização por alto cisalhamento com gotejamento da fase aquosa na fase oleosa em

ultrassonicador, 3: processo de centrifugação para separação do sobrenadante e quantificação indireta dos compostos fenólicos para a determinação da eficiência de encapsulação.

5. 3. Diâmetro Médio (DM) e Índice de Polidispersão (IPD)

O DM e o IPD das NP's foram determinados usando dispersão de luz dinâmica no equipamento para medida do espalhamento dinâmico da luz - *Dynamic Light Scattering* (DLS). As NP's foram diluídas em água ultrapura MiliQ (1:300), transferidas a uma cubeta e analisadas num ângulo de espalhamento de 90°, comprimento de onda de 660 nm e temperatura de 25 °C.

5. 4. Potencial Zeta

O potencial zeta foi determinado com o auxílio do aparelho *Zeta Sizer* através da mobilidade por eletroforese, na temperatura de 25 °C e potencial de ± 150 mV. As amostras foram diluídas em solução de KCl 1 mM e analisadas em triplicata. Avaliou-se a carga superficial do EEP, Nanopartícula Carregada (NPC), Nanopartícula Vazia (NPV), e da Lecitina.

5. 5. Eficiência de Encapsulação (EE%)

A eficiência de encapsulação foi determinada utilizando o método indireto, a partir da quantificação dos compostos fenólicos totais (ZHANG et al., 2018). A quantificação do total de compostos fenólicos foi realizada a partir do método de Folin-Ciocalteu com adaptações (FOLIN; DENIS, 1912; ELBAZ et al., 2016). O método de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngico pelos compostos fenólicos, produzindo uma reação de coloração azul intensa (FOLIN; DENIS, 1912).

As soluções foram obtidas a partir de uma solução estoque de 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, utilizando-se uma curva analítica do ácido gálico como padrão nas concentrações lineares de (10, 20, 40, 50 e 60 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) (n=3). Para a realização da leitura do ensaio, o EEP foi diluído em água ultrapura na proporção de 1:300. A água destilada foi utilizada como branco.

Para o ensaio, utilizou-se 250 µL de amostra, 250 µL do reagente Folin-Ciocauteu e 500 µL de água, permanecendo em agitação por 5 minutos. A esta mistura adicionou-se 250 µL de carbonato de sódio. A solução permaneceu em repouso por uma hora ao abrigo da luz. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro de Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível (UV-Vis) ($\lambda = 760 \text{ nm}$).

A eficiência de encapsulação foi calculada a partir da (Equação 1), que correlaciona a quantidade de própolis utilizada na solução para preparo das NP's e a quantidade de própolis livre no sobrenadante, após a centrifugação das NP's.

Equação 1- Determinação da EE%.

$$EE \% = 100 - \frac{\text{Compostos fenólicos livres}}{\text{Compostos Fenólicos iniciais}} \times 100$$
$$LC = \frac{\text{quantidade de Compostos Fenólicos encapsulados}}{\text{volume de sobrenadante}} \times 100.$$

Em que: EE%: Eficiência de encapsulação e LC: mg equivalentes de ácido gálico.

5. 6. Análise Morfológica das Nanopartículas

A análise morfológica das NP's foi realizada no equipamento MEV FEI SCIOS. Para o ensaio, a amostra foi diluída em água (1:200) e colocada sob um *stub* para secagem. O *stub* foi submetido a revestimento de ouro e submetido à voltagem de aceleração de 15,00 Kv. O ensaio foi realizado com o apoio do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

5. 7. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier

Os espectros foram obtidos do EEP líquido, e NPC e NPV em forma de pó, sendo analisados no equipamento Perkin Elmer Spectrum IR, com faixa de escaneamento de 400-4500 cm^{-1} .

5. 8. Estudo da liberação em fluido gastrointestinal in vitro

5. 8. 1. Ensaio de solubilidade do EEP em Fluido Gástrico Simulado (FGS) e Fluido Intestinal Simulado (FIS)

Inicialmente avaliamos a solubilidade do EEP nos FGS e FIS a fim de determinar a condição *sink*, para avaliar a saturação do meio durante o estudo, sem exceder 10% da solubilidade (GIBALDI & FELDMAN, 1967).

O FGS foi preparado em pH 1,2 e o FIS em pH 6,8. A avaliação foi realizada com e sem a presença de tensoativo Tween 80 1%. Sendo as amostras mantidas sob agitação 236,4 g, 37 °C durante 48 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas 24428 g durante 15 minutos, a 15 °C. E a determinação total dos compostos fenólicos foi realizada por Folin-Ciocalteu, conforme descrito no item 5. 5.

5. 8. 2. Liberação do EEP das NPC's em FGS e FIS

O ensaio de liberação foi conduzido a partir da condição *sink*. Aproximadamente, 73,5 µL de NPC foi incubado em 1 mL de FGS a 37 °C sob agitação a 150 rpm, e após 2 horas a suspensões de NP's foram centrifugadas, nas mesmas condições do item 5. 8. 1 e introduzidas no FIS por mais 4 horas. Nos intervalos de (1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas), as amostras foram centrifugadas e o volume foi reconstituído ao volume inicial. Os sobrenadantes de cada intervalo foram analisados por Folin-Ciocalteu. A quantidade cumulativa de EEP liberado das NPC's foi calculada a partir da Equação 2:

Equação 2- EEP cumulativo liberado das NPC's

$$\% \text{ Cumulativa} = \text{QL}/\text{Qo} \times 100$$

Onde:

QL é a quantidade de EEP liberada das NPC's no tempo (t) e Qo, a quantidade inicial de EEP presente nas NPC's.

O resultado foi plotado em uma curva de percentual cumulativo de EEP liberada em função do tempo.

5. 9. Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de Diluição em Caldo do CLSI

5. 9. 1. Microrganismos

A atividade antifúngica da nanoemulsão foi avaliada frente a cepas de *Candida* spp previamente identificadas, sendo uma cepa padrão de *C. albicans* 0546 VITROIDS™ (Sigma-Aldrich) e quatro cepas clínicas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, oriundas do Instituto Adolfo Lutz (2018) (ANEXO 1). As cepas foram mantidas preservadas sobre refrigeração em Caldo Sabouraud Dextrose.

5. 9. 2. Atividade Antifúngica pelo Método de Microdiluição em Caldo do CLSI

As leveduras foram cultivadas duas vezes antes dos ensaios em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), por 24 horas a 36 ± 2 °C. A avaliação da atividade antifúngica das NP's foi realizada a partir de adaptação do método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2002, documento M27-A2.

Após o repique de 24 horas, preparou-se uma suspensão de células em solução salina estéril 0,85% de NaCl, padronizadas de acordo com a escala de 0,5 McFarland (aproximadamente $0,5-2,5 \times 10^3$ células. mL⁻¹). A densidade celular foi confirmada por espectrofotometria, $\lambda = 530$ nm, absorvância entre (0,08 – 0,1). A partir desta suspensão, foi realizada uma diluição (1:50 e 1:20) em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI- 1640) com 2% de glicose, sendo que a concentração final das células testadas na microplaca foi de $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ células. mL⁻¹.

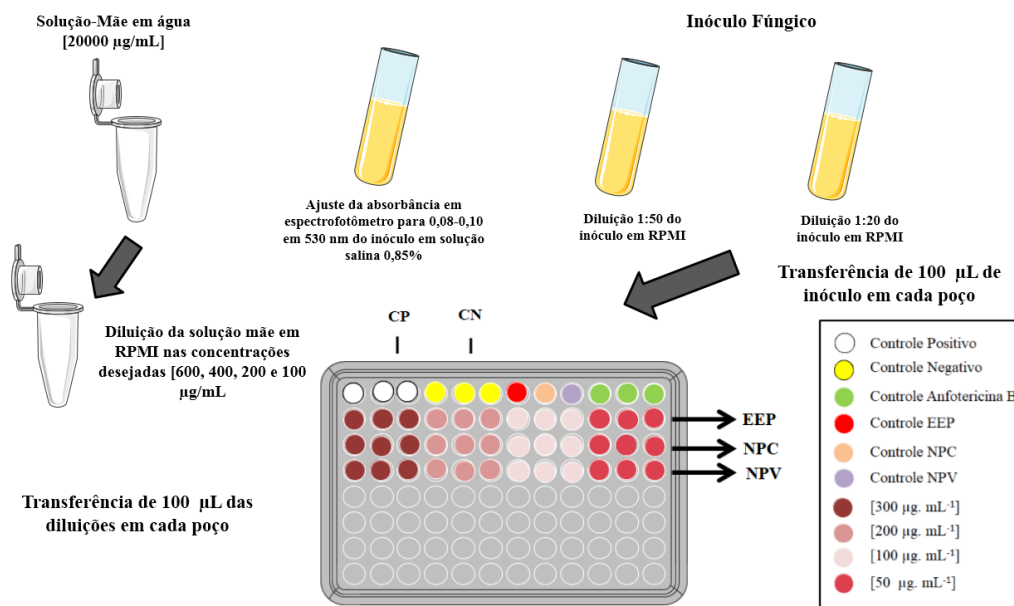
Foram preparadas soluções-mãe em água das amostras a serem testadas, (a) EEP e (b) NPC, na concentração de 20000 µg. mL⁻¹ em tubo de ensaio, a concentração foi definida a partir da EE% encontrada no estudo. A solução mãe de (c) NPV foi preparada com concentração de lecitina proporcional à da nanopartícula carregada e mesmo volume. A partir das soluções mãe, foram preparadas diluições em RPMI-1640 de (a), (b) e (c) nas concentrações de 600 µg. mL⁻¹, 500 µg. mL⁻¹, 400 µg. mL⁻¹, 300 µg. mL⁻¹, 200 µg. mL⁻¹, 100 µg. mL⁻¹ e 50 µg. mL⁻¹.

A suscetibilidade das cepas testadas também foi avaliada frente a um antifúngico convencional Anfotericina B. Preparando-se uma solução-mãe em Dimetilsulfóxido (DMSO)/etanol (1:10) de 1 mg. mL^{-1} para uma concentração final de $6 \text{ } \mu\text{g. mL}^{-1}$, como controle positivo.

A microdiluição em caldo foi realizada em microplacas estéreis de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura sintético RPMI-1640 com tampão MOPS (ácido 3[N-morfolino] propanosulfônico) $0,165 \text{ mol. L}^{-1}$, com L-glutamina, pH 7,0 suplementado com 2% de glicose. O meio de cultura foi esterilizado por processo de filtração utilizando membrana $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ com auxílio de bomba a vácuo.

Utilizou-se $100 \text{ } \mu\text{L}$ de cada diluição e $100 \text{ } \mu\text{L}$ da suspensão de células em cada pocinho. As alíquotas foram distribuídas como descrito na Figura 3. Em todas as placas utilizou-se um controle positivo de crescimento (CP) com a suspensão de células e o meio de cultura e um controle negativo de crescimento (CN), apenas com o meio de cultura. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 3- Esquema de inóculo para avaliação da atividade antifúngica do EEP, NPC e NPV sobre cepas de *Candida* sp em meio RPMI.



As microplacas foram incubadas em estufa de $36 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$ por 24 horas. Após 24 horas, $20 \text{ } \mu\text{L}$ de cada pocinho foi diluído (1:200) em um tubo de ensaio contendo em $3,98 \text{ mL}$ de água. Dessa diluição, $100 \text{ } \mu\text{L}$ foi inoculado em ASD, realizando-se o estriamento com swab, e as placas de cultura foram incubadas por 24 horas em estufa a $36 \pm 2 \text{ } ^\circ\text{C}$. Após 24 horas, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de

Colônias (UFC. mL⁻¹) de cada placa de cultura e calculou-se a média e desvio padrão das triplicatas.

5. 10. Avaliação da atividade citotóxica ex vivo em hemácias

5. 10. 1. Preparação das Hemácias

O ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) sob parecer nº 3.231.864/2018 (ANEXO 2). Foram coletados 5 mL de sangue de um indivíduo voluntário saudável, com idade acima de 18 anos, após prévia assinatura de Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE). Realizou-se punção venosa periférica, obedecendo às normas de biossegurança, com assepsia do local da punção com a utilização de álcool 70% e equipamento de proteção individual como luva de procedimento pelo responsável pela coleta. A coleta foi efetuada por profissional habilitado. Após a coleta, o sangue obtido foi colocado em tubo de vidro contendo 10 µL de EDTA, homogeneizado e então centrifugado (5 min, 4 °C, 1891 g). Retirou-se o plasma e a camada de leucócitos por aspiração. Em seguida, a suspensão de hemácias foi lavada em solução gelada de tampão PB 10 mmol. L⁻¹, pH 7,4 por três vezes. Posteriormente, as hemácias foram ressuspensas em PBS 10 mmol.L⁻¹, pH 7,4.

5. 10. 2. Atividade citotóxica ex vivo sobre hemácias

A atividade citotóxica sobre hemácias foi avaliada a partir da metodologia seguida por Espada et al (2008) nas concentrações de 200 µg. mL⁻¹ e 50 µg. mL⁻¹ do EEP, NPC e NPV, sendo as amostras diluídas em PBS 10 mmol. L⁻¹, pH 7,4, contendo 1,08 g. L⁻¹ de glicose, 0,3 g. L⁻¹ de penicilina e 0,5 g. L⁻¹ de estreptomicina. Utilizou-se ainda um controle positivo de hemólise, controle tampão e controle etanol, sendo o controle positivo uma solução de Anfotericina B (20 µg. mL⁻¹), o controle tampão (hemácias + tampão) e o controle etanol (hemácias + etanol). Utilizou-se 15 µL de cada amostra e 485 µL da suspensão de hemácias 3% em todas as análises, nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

As amostras permaneceram incubadas em agitador orbital a 37 °C, sob agitação constante (236 g). Decorrido o tempo de cada leitura, realizou-se a centrifugação de cada amostra (5 min, 4 °C, 1200 g). A determinação da citotoxicidade foi expressa a partir do conteúdo de hemoglobina liberado após centrifugação, através da absorbância ($\lambda = 540$). Todas as análises foram realizadas em triplicata. O percentual de hemólise foi calculado a partir da Equação 3:

Equação 3- Percentual de hemólise.

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{Abs teste} - \text{Abs hemólise 100\%}}{\text{Abs teste}} \times 100$$

Em que, Abs teste percentual de hemólise das amostras, Abs hemólise 100% percentual do controle Anfotericina B.

5. 11. Estabilidade

Foram avaliadas duas condições de armazenamento das NP's, sendo 1) temperatura ambiente 25 °C ± 5 °C e 2) refrigeração 8 °C ± 4, após 28, 56 e 84 dias. Nesse período, leituras do diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta foram realizadas. Para cada amostra, calculou-se média e desvio padrão.

5. 12. Análise Estatística

Os dados são apresentados com média, e desvio-padrão a partir das concentrações testadas. Admitindo-se um intervalo de confiança de 95%. As análises estatísticas para os ensaios biológicos foram realizadas no OriginPro8, sendo aplicada a análise de variância One-way ANOVA seguido de pós-teste de Dunnett para comparar as médias das amostras com a média do controle do ensaio de hemólise. Além disso, aplicou-se pós-teste de Tukey para os demais ensaios. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significativas para valores obtidos nos experimentos.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Diâmetro Médio e Índice de Polidispersão

O DM das NPC's neste estudo foi de $264,7 \pm 11,05$ nm, com distribuição de tamanho bimodal, podendo ser considerado adequado para via de administração oral (Tabela 2). O perfil bimodal indica a presença de variações entre os tamanhos das NP's, não sendo uma amostra totalmente homogênea, ou seja, há grupos de NP's com variação de tamanho na formulação, porém, mantém o diâmetro reduzido. Quanto $< 0,3$ o índice de polidispersão, mais homogêneo é considerado o sistema.

Tabela 2- Caracterização físico-química de NP's de EEP quanto a diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta e percentual de eficiência de encapsulação (n=3).

	Diâmetro médio (nm)	Índice de Polidispersão	Potencial Zeta (mV)	EE (%)
NPC	$264,7 \pm 11,1$	$0,247 \pm 0,039$	$-38,7 \pm 3,30$	$93,32\% \pm 0,50$
NPV	$220,2 \pm 6,8$	$0,148 \pm 0,015$	$-45,1 \pm 5,45$	N/A

Essa análise fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos para todas as dispersões obtidas indicando a formação de sistemas nanodispersos em líquido (PANDEY et al., 2005; YAKUGAKU, 2019). Na técnica de DLS, também conhecida como espectroscopia de correção de fótons, um feixe monocromático de laser interage com a amostra e um detector registra a luz dispersa em um determinado ângulo (STETEFELD et al., 2016). O resultado é medido pelas flutuações da intensidade da luz através do movimento Browniano das partículas (CARVALHO et al., 2018; FINSY & JAEGER, 1991). Nanoemulsões admitem tamanho de 20 a 300 nm (JAISWAL; DUDHE; SHARMA, 2015; BONFERONI et al., 2019).

No estudo de LLK e colaboradores (2017) NP's de lecitina/quitosana foram desenvolvidas para a encapsulação do Kaempferol. O estudo obteve NP's com diâmetro médio de 270 nm e índice de polidispersão de 0,2, resultados semelhantes a este estudo. Análises de morfologia e superfície são importantes para um sistema nanoestruturado de liberação de moléculas e podem estar associadas à quantidade dos produtos utilizados na produção das NP's (MICHAL; EWA; TOMASZ, 2015).

No estudo de Quatrin e colaboradores (2017), uma nanoemulsão contendo óleo de *Eucalypto globulus* foi desenvolvida, com diâmetro médio de 76 nm e índice de polidispersão também na mesma distribuição que no presente estudo, de 0,22. A nanoemulsão foi testada para atividade antifúngica frente a *C. albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata* por macrodiluição, obtendo Concentração Fúngica Mínima (CFM) de 0,7 mg. mL⁻¹ e 1,4 mg. mL⁻¹ respectivamente).

No trabalho de Yanasarn e colaboradores (2009), as NP's para carreamento do docetaxel foram preparadas a partir de uma emulsão de lecitina, sendo a lecitina também preparada em água. O tamanho médio das NP's foi de aproximadamente 270 nm e estas apresentaram morfologia esférica. A lecitina foi utilizada por sua característica biocompatível.

6. 2. Potencial Zeta

No presente estudo, observa-se um potencial elevado para as NP's, acima de -30 mV (Tabela 3), podendo estar associado à estabilidade apresentada pelo sistema, sem a presença de agregação e precipitação das NP's.

Além disso, a partir dos valores de potenciais da lecitina e própolis individuais, podemos sugerir que a elevação do potencial nas NPC's em relação ao EEP pode estar associada com a presença da lecitina na superfície das NP's, uma vez que o potencial da lecitina é mais negativo.

Tabela 3- Potencial zeta observado na NPC e NPV e os componentes presentes na formulação da nanoemulsão (n=3).

	NPC	NPV	EEP	Lecitina
Potencial Zeta (mV)	-38,7±3,30	-45,1±5,45	-33,5±5,83	-48,4±6,24

Essa análise permite conhecer a carga superficial das NP's, que interferem no processo de interação de repulsão ou atração da NP's com o tecido. Esse parâmetro sofre interferência de diferentes grupos funcionais presentes na superfície das NP's ou ainda por íons dispersos no meio aquoso da suspensão (KUMARI et al., 2010; FERNANDEZ et al., 2018).

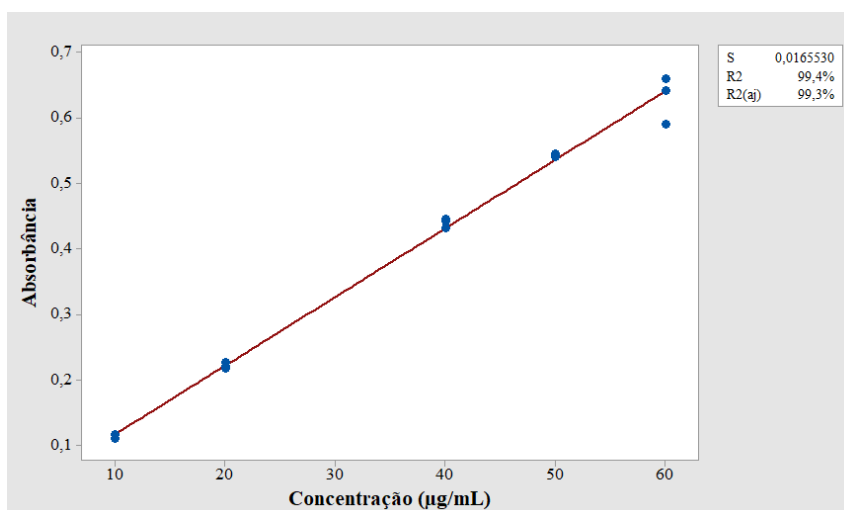
As partículas se movem na direção contrária, onde a velocidade do deslocamento é medida, a qual determina quão rápido uma partícula se move em um campo elétrico. Esta técnica verifica a carga superficial de partículas, que é importante para prever a estabilidade das soluções, e quanto mais alto o potencial zeta for (>30 mV), melhor é a estabilidade da suspensão, pois as partículas irão se repelir evitando agregações (AHMAD et al., 2016).

No estudo de Smith e colaboradores (2017) houve uma relação linear entre a concentração de lipídios utilizados no desenvolvimento da formulação e o potencial zeta observado. Al-Remawi e colaboradores (2017) também observaram a influência da proporção de lecitina presente nas NP's desenvolvidas e a variação negativa do potencial zeta. A mesma variação também foi observada na caracterização realizada por Dai e colaboradores (2016) em nanopartícula de zeína/lecitina, em que quanto maior a proporção de lecitina adicionada, mais negativo o potencial zeta das NP's.

6.3. EE%

No presente trabalho, os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g. mL}^{-1}$). Na Figura 4 está disposta a curva de calibração obtida que deu origem à equação de regressão utilizada para obter as concentrações desconhecidas dos valores de absorbância foi $y = 0,01250 x + 0,01047$, com coeficiente de regressão linear $R^2 = 0,9943$. A partir da concentração equivalente de ácido gálico, a eficiência de encapsulação observada foi de 93,32% (Tabela 2).

Figura 4- Curva analítica do ácido gálico (10, 20, 40, 50 e 60 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) utilizada na determinação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.



O método indireto é utilizado para avaliar a quantidade de molécula não encapsulada na nanopartícula a partir da análise do sobrenadante (DANESHMAND et al., 2018). A quantificação da substância encapsulada em uma nanopartícula é fundamental para prever a eficiência dos sistemas, atividades biológicas associadas e estabelecer a quantidade da substância perdida durante o processo de produção (HONG et al., 2017).

Como descrito anteriormente (item 2.2), a própolis tem uma composição bem diversa. E entre os componentes da própolis, os compostos fenólicos se apresentam de forma abundante a depender de sua origem (ANDRADE et al., 2017; SHAVISI et al., 2017), sendo responsáveis por diversas atividades biológicas apresentadas pela própolis (INUI et al., 2014; CORTÉS-HIGAREDA et al., 2019).

Nesse sentido, a quantificação dos compostos fenólicos presentes no sobrenadante das NP's desenvolvidas para encapsular a própolis e outros produtos naturais tem sido amplamente utilizada (ELBAZ et al., 2016; NUNES et al., 2017; ROSSETO et al., 2017; ZHANG et al., 2019). Além da associação com compostos fenólicos, é possível avaliar ainda a presença dos flavonoides para avaliar a eficiência de encapsulação da própolis em NP's (NASCIMENTO et al., 2016; ONG et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2019).

No estudo de Ferreira et al., (2014), uma micropartícula contendo própolis e metronidazol foi desenvolvida e caracterizada. Com diâmetro médio de 1,23 μm o sistema apresentou eficiência de encapsulação de 91,41% para a própolis a partir da quantificação de compostos fenólicos. Zhang e colaboradores (2019) também avaliaram a eficiência de encapsulação de NP's de zeína/caseinato/alginate para encapsulação de própolis a partir dos compostos fenólicos, atingindo uma eficiência de encapsulação de $86,5 \pm 0,7\%$.

Em outro sistema para liberação da própolis a partir de niossomas em filmes mucoadesivos a eficiência de encapsulação esteve próxima a $91,0 \pm 0,5\%$ (ARAFI et al., 2018). NP's de quitosana desenvolvidas por Ong et al., (2017) com diâmetro médio de 247,1 nm, índice de polidispersão de 0,225 e potencial zeta de 45,2 mV apresentaram 88,8% de eficiência de encapsulação e o sistema apresentou atividade antimicrobiana frente a biofilme de *E. faecalis*.

A eficiência de encapsulação dos sistemas para administração de NP's é importante por estar diretamente associada à atividade biológica que a molécula pode desempenhar (ONG et al., 2016; JEMAA; FALLEH; KSOURI, 2019). Quanto maior a

eficiência de encapsulação maior a capacidade do composto atingir a eficácia desejada em relação à atividade biológica (SILVA-BRUNELLO et al., 2016).

A partir do nosso estudo, podemos observar que o sistema desenvolvido apresentou eficiência de encapsulação próximo a outros sistemas desenvolvidos para carregamento da própolis. Uma eficiência de encapsulação alta é um fator importante na redução da perda de matéria-prima, tornando o processo economicamente viável (FRANCISCO et al., 2017).

No entanto, a capacidade de encapsulação varia de acordo com a metodologia escolhida e proporção dos produtos, além da capacidade da molécula encapsulada de interagir com a superfície da nanopartícula (SHARMA; MADAN; LIN, 2016; RANI, 2019; SRIKAR, 2019).

6. 4. Análise Morfológica das Nanopartículas

A partir da análise do MEV foi possível observar a presença de NP's com tamanho reduzido na escala de 400 e 500 nm, de forma esférica e sem agregados na superfície (Figura 5). Além disso, a ausência de agregados confirma a formação da nanopartícula. Uma possível justificativa para a variação entre o diâmetro observado no DLS e no MEV está relacionada com o princípio da técnica utilizada em cada análise (CASA et al., 2018).

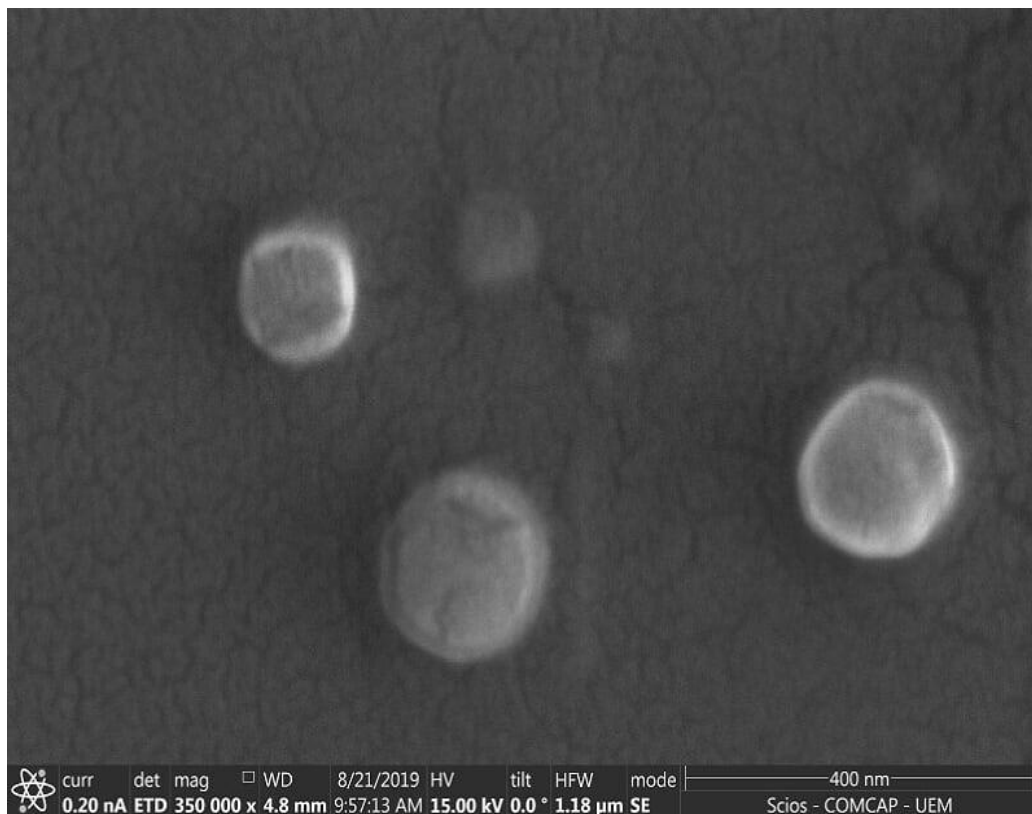
Observa-se ainda a presença de NP's menores dispersas, sendo que essa variação entre os tamanhos é característica do perfil bimodal das NP's já apresentado pelo índice de polidispersão. E ainda, as pequenas irregularidades que podem ser vistas na superfície podem ser decorrentes do processo de secagem, principalmente pela presença da fase oleosa (HOSSEINI et al., 2016).

Entre as possibilidades, a forma esférica facilita o processo de difusão no organismo e comunicação com as células, podendo aumentar a biodisponibilidade da molécula carregada (CARBONI et al., 2014; KHAN; SAEED; KHAN, 2019).

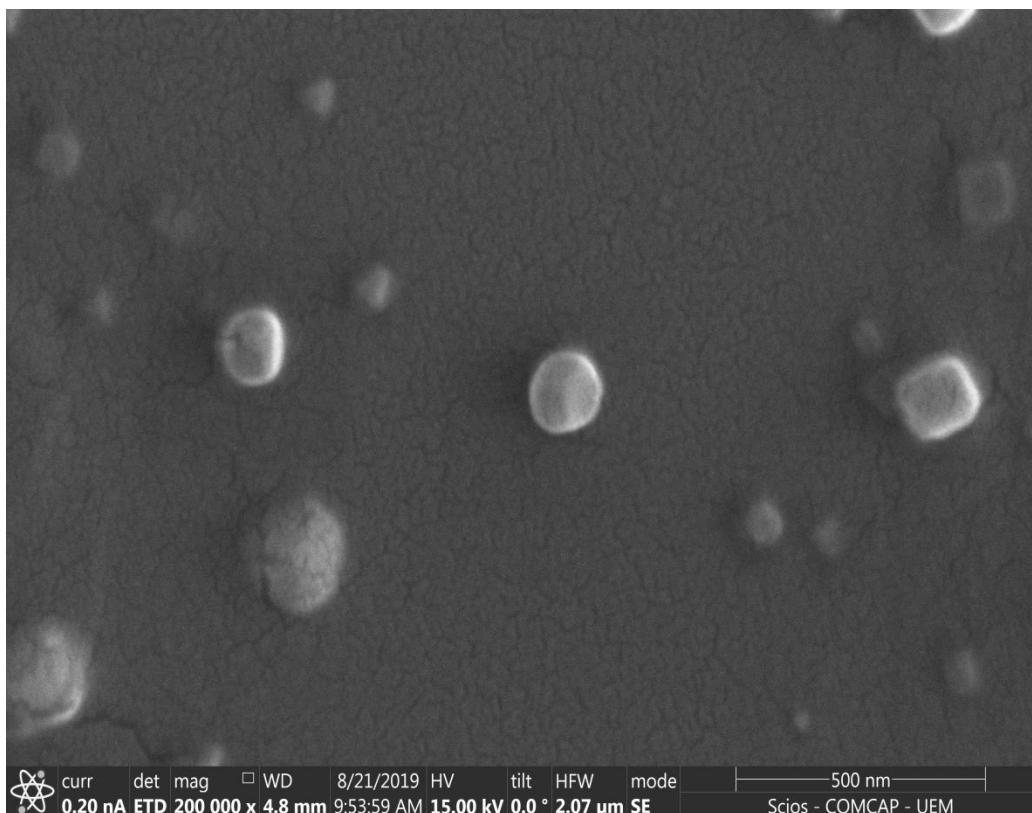
Roy e colaboradores (2010) desenvolveram NP's de ouro e prata para carregamento de própolis e flavonoide com diâmetro médio de 20 nm, as quais apresentaram morfologia esferoidal. Porém, em menor abundância outras formas geométricas também foram observadas como hastes e formas triangulares.

Figura 5- Eletromicrografias das NP's de lecitina contendo EEP. Em que: A (400 nm) e B (500 nm).

A



B

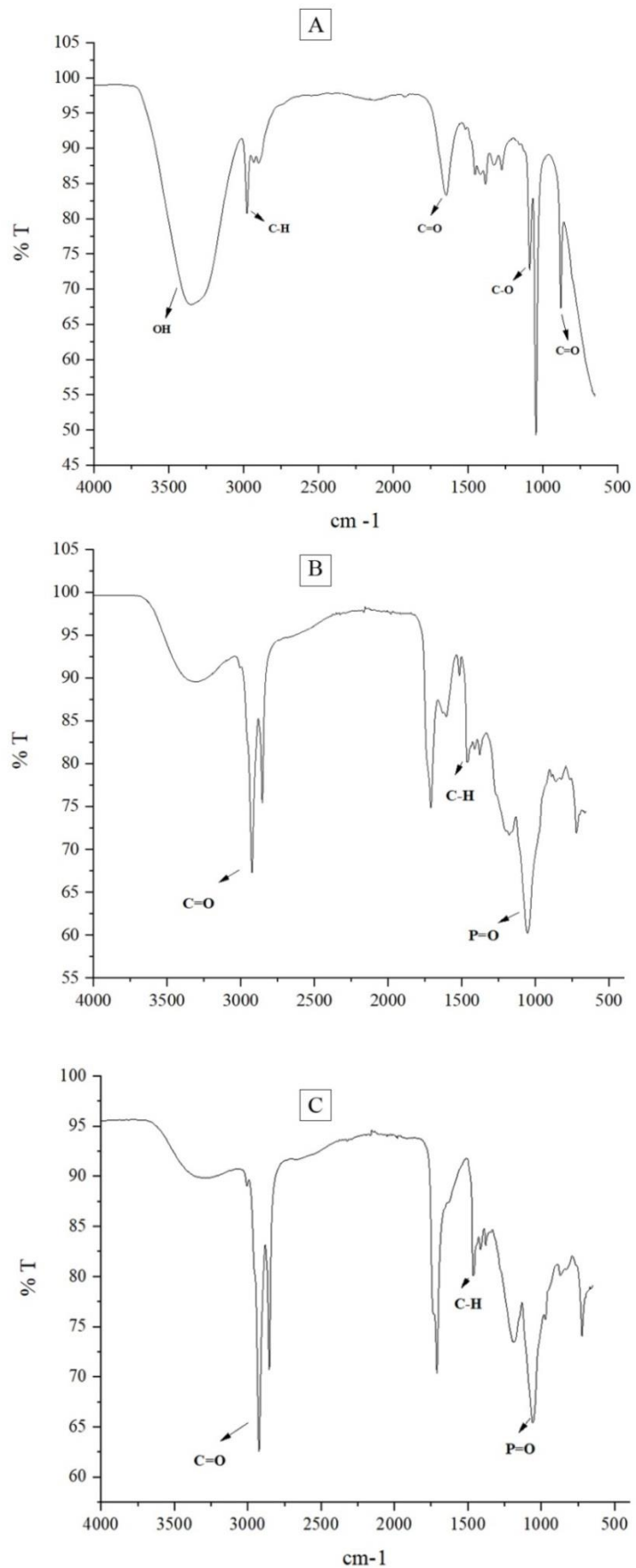


NP's sólidas lipídicas preparadas por ultrassonicação e emulsificação por fusão para transporte de cera de própolis, cera de abelha e óleo de semente de romã foram desenvolvidas por Soleimanian e colaboradores (2018), as quais apresentaram diâmetro médio entre 71 e 366 nm. Nesses sistemas, observou-se morfologia esférica nas NP's, assim como no presente estudo.

6. 5. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Por meio da avaliação de FTIR foi possível obter informações sobre a composição química do EEP (Figura 6A). O espectro de FTIR do EEP exibiu banda de absorção em torno de 1652 cm^{-1} que pode ser atribuído à vibração de carbonila (C=O) de flavonoides e lipídeos. O espectro também exibiu uma vibração entre 1050 e 1200 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação entre carbono e oxigênio (C-O) oriundo de fenóis e álcoois, sobretudo do solvente. Entre 2900 e 3400 cm^{-1} é possível observar uma banda intensa atribuída à absorção das hidroxilas (OH). Outra banda característica apareceu em 880 cm^{-1} com uma banda de deformação angular de média intensidade, devido à deformação angular fora do plano da C=O de ácidos carboxílicos (ELBAZ et al., 2016).

Os espectros FTIR da NPC e NPV (Figura 6B e 6C) apresentaram bandas semelhantes em 2922 cm^{-1} correspondente à carbonila de ácidos graxos e em 1447 cm^{-1} referente ao grupamento metil, característico da lecitina utilizada como polímero nas NP's (HAFNER et al., 2011; AHMADITABAR et al., 2017). Outra vibração em 1053 cm^{-1} referente ao grupo fosfato também foi observada. As variações observadas entre NPC e NPV estão relacionadas à intensidade de vibração das moléculas, sem interação química entre os grupos funcionais e o polímero. A análise espectral indica que as NP's de lecitina podem fisicamente encapsular EEP, indicando que o EEP foi incorporado nas NP's (RASSU et al., 2015, JARDIM et al., 2020).

Figura 6- Espectro FTIR de (A) EEP, (B) NPC, (C) NPV.

6. 6. Estudo da liberação em fluido gastrointestinal in vitro

6. 6. 1. Ensaio de solubilidade do EEP em FGS e FIS

A avaliação da solubilidade do EEP nos fluídos simulados apresentou melhor solubilidade no meio que continha Tween 80 1%, tanto no FGS e FIS (Tabela 4). Nesse sentido, o ensaio de liberação foi conduzido na presença do surfactante.

Tabela 4-Solubilidade do EEP nos FGS e FIS, a 37 °C, 150 rpm, para ensaio de liberação, (n=3).

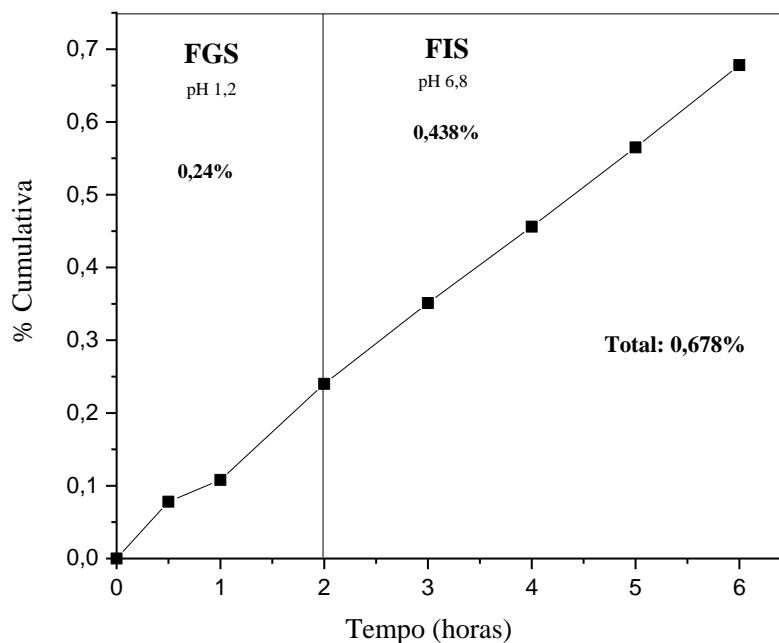
Meios	Solubilidade (mg. mL ⁻¹ ± DP)
FGS sem Tween 80 1%	0,636 ± 0,066
FIS sem Tween 80 1%	1,110 ± 0,180
FGS com Tween 80 1%	1,259 ± 0,188
FIS com Tween 80 1%	1,115 ± 0,296

6. 6. 2. Liberação do EEP das NPC's em FGS e FIS

Por meio desse ensaio, foi possível determinar o perfil de liberação do EEP encapsulado nas NPC's e o percentual liberado a partir das mudanças de pH dos fluídos (FGS e FIS). Avaliação importante para um sistema de liberação oral das NP's.

Observa-se um baixo percentual total após 6 horas de ensaio. Sendo que, na primeira hora de avaliação, ocorreu uma liberação acumulada de 0,078%, característica de um efeito “*burst*”, com uma quantidade de EEP que possa estar aderido externamente na matriz polimérica (LU et al., 2011). Após esse efeito de liberação em FGS foi considerada baixa, fator relevante, pois a NPC pode ter protegido o EEP da degradação em pH 1,2, limitação importante na administração oral do EEP.

Figura 7- Perfil de liberação *in vitro* do EPP a partir das NPC's em FGS (pH 1,2) e FIS (pH 6,8), com Tween 80 1%, a 37 °C, sob agitação de 150 rpm.



A partir das 3 horas de ensaio, o percentual de liberação em FIS foi de 0,438 % e permaneceu cumulativo ao final das 6 horas. Esse resultado indica uma liberação sustentada do EEP a partir da NPC (KAUSHIK et al., 2020).

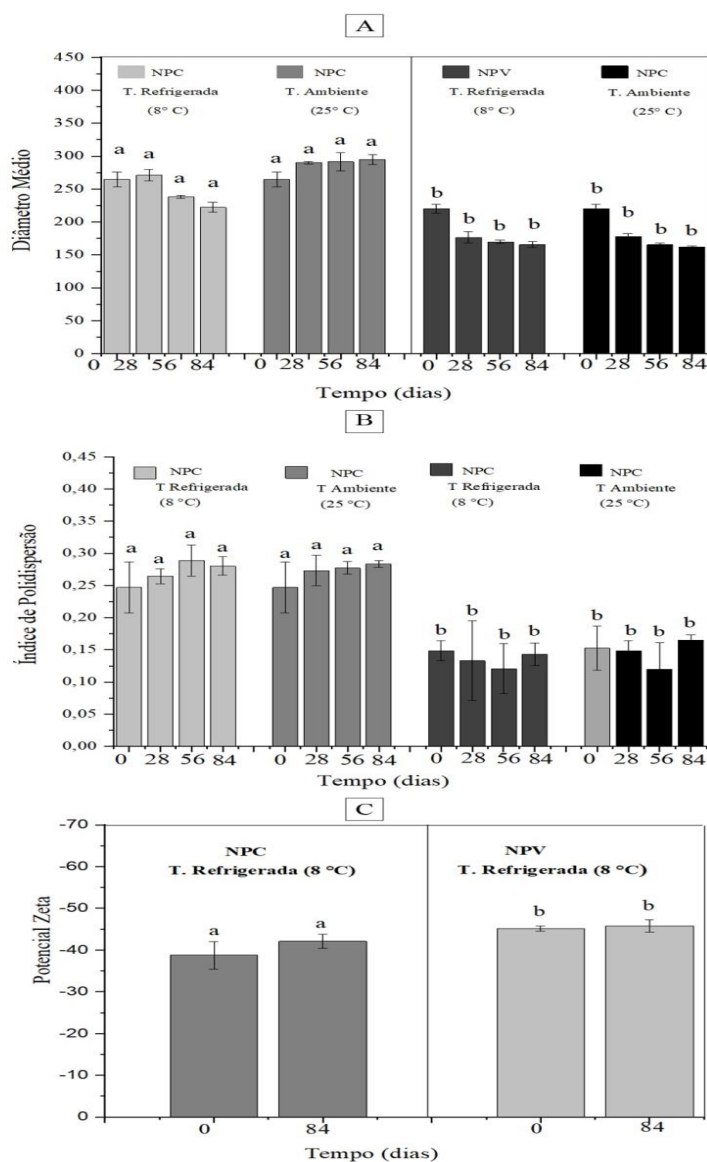
No estudo de Ong et al (2017), com NP's de quitosana contendo própolis, tiveram uma liberação em tampão PBS aumentada nas primeiras horas do ensaio de liberação, e ao final de 48 horas de ensaio quase 90% da própolis foi liberada de forma sustentada e controlada. Resultado semelhante também foi encontrado no estudo de Iadnut et al (2019), em NP's de PLGA carregadas com extrato etanólico de própolis, em que observou-se uma liberação prolongada e sustentada.

Zhang et al (2019), avaliaram o perfil de liberação da própolis encapsulada em nanopartícula de zeína/caseína e alginato em FGS e FIS, e também observaram baixa liberação em fluido gástrico, confirmando o resultado encontrado em nosso estudo e a degradação da própolis neste fluido.

6.7. Estabilidade

No presente estudo, a formulação apresentou-se macroscopicamente estável sem formação de duas fases, nem floculação durante todo o período analisado. Com base nos dados apresentados na Figura 8, podemos observar que a nanoemulsão não apresentou alteração do diâmetro médio em temperatura refrigerada ($8\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$) e ambiente ($25\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) decorridos 84 dias de avaliação ($p < 0,05$), diferindo as análises apenas entre a NPC e NPV.

Figura 8- Estabilidade das NP's sob diferentes condições de armazenamento em Temperatura Refrigerada ($8\text{ °C} \pm 4\text{ °C}$) e Temperatura Ambiente ($25\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$) para o parâmetro diâmetro médio (A), índice de polidispersão (B) e potencial zeta (C).



Onde: os dados são apresentados na forma de média \pm DP para um conjunto amostral de $n = 3$. Médias sinalizadas com letras diferentes apresentam diferenças estatísticas para um nível de confiança de 95% pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

A análise do IPD auxiliou na compreensão da distribuição de tamanho das NP's que permaneceram estáveis e abaixo de 0,30 em todo período analisado. Isso indica que o sistema desenvolvido tem propriedades que favorecem sua estabilidade e o armazenamento a longo prazo. A avaliação do potencial zeta após 84 dias também permaneceu estável, sem diferença significativa.

Entre os parâmetros importantes para caracterização de sistemas de distribuição de moléculas, a estabilidade é fundamental. Uma vez que está relacionada com a distribuição e liberação da molécula no organismo. Em um sistema com baixa estabilidade, a molécula pode sofrer liberação prematura, levando ao aumento da biodisponibilidade em níveis elevados, e isso acarretar no desenvolvimento de efeitos tóxicos indesejados nos tecidos, além de diminuição da eficácia no tecido alvo (MILLER et al., 2013; CHEN et al., 2014).

Em geral, os problemas de estabilidade apresentados pelas NP's se relacionam com agregação, floculação, separação de fases, formação de cristais e coalescência (WU; ZHANG; WATANABE, 2011; SINGH et al., 2017). A estabilidade das NP's pode estar associada a vários fatores, entre eles a forma farmacêutica, meio de dispersão, via de administração, técnica de produção e natureza do medicamento (TADROS et al., 2004; WU; ZHANG; WATANABE, 2011).

A lecitina tem sido utilizada no desenvolvimento de diversos sistemas por proporcionar maior estabilidade. No estudo de Cui et al (2006) observou-se que as NP's de lecitina desenvolvidas para carregamento de vacinas de DNA, permaneceram estáveis em temperatura ambiente sem alterações significativas de tamanho por 6 meses.

No trabalho de Edris (2012), uma nanopartícula a base de lecitina para um suplemento alimentar permaneceu estável à temperatura ambiente de 25 °C no período de 60 dias, com aumento do tamanho das NP's durante o período e distribuição bimodal. Esse comportamento foi justificado pela degradação e hidrólise dos fosfolipídios em condições ácidas, que pode ter ocorrido mais rapidamente com o aumento da temperatura.

No estudo de Di-Bello et al., (2017), uma nanovesícula de cardanol foi desenvolvida para encapsulação de Cannabidiol em meio aquoso. A estabilidade foi

observada em temperatura ambiente de 20 °C \pm 5 °C e refrigerada de 4 °C \pm 4°C resultando num sistema estável até 30 dias.

6. 8. Avaliação da Atividade Antifúngica

No presente estudo a atividade antifúngica foi avaliada a partir da metodologia descrita no item 5. 9. E os resultados são apresentados a partir da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 50% de crescimento e contagem das UFC's das leveduras submetidas ao EEP, NPC e NPV.

Observou-se que o EEP apresentou CIM 50% em 300 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ a 600 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ nas cepas testadas, enquanto que a NPC apresentou CIM 50% em 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para *C. albicans* 0546 VITROIDS™ e *C. glabrata* clínica. Tanto para o EEP quanto para a NPC a atividade inibitória foi dose dependente. Nenhuma das cepas fúngicas avaliadas sofreram inibição de crescimento pelas NPV, sugerindo que os componentes da NPV não apresentam atividade antifúngica (Tabela 5).

Tabela 5- Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g. mL}^{-1}$ do EEP, NPC e NPV frente às cepas *C. albicans* 0546 VITROIDS™, *C. albicans* clínica, *C. glabrata* clínica, *C. tropicalis* clínica e *C. parapsilosis* clínica. Onde: N/O: Não observada.

	<i>C. albicans</i> 0546 VITROIDS™	<i>C. albicans</i> Clínica	<i>C. glabrata</i> Clínica	<i>C. tropicalis</i> Clínica	<i>C.</i> <i>parapsilosis</i> Clínica
	CIM 50% ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)				
EEP	300	300	300	600	600
NPC	200	300	200	300	300
NPV	NO	NO	NO	NO	NO

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) só foi observada na concentração de 300 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ do EEP em *C. albicans* 0546 VITROIDS™ e por isso não está representado na Figura 9. No entanto, nas demais concentrações, em relação ao crescimento de UFC's nas placas de semeadura com ASD do controle positivo, a concentração de 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$), não demonstrando inibição de crescimento. Em 100 e 50 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ houve um aumento das UFC's em relação ao controle positivo. Isso pode estar associado com a ação rápida do EEP livre ao longo das 24 horas de ensaio e o crescimento dos microrganismos.

Em relação à NPC, observou-se inibição do crescimento de UFC's nas concentrações de 300, 200 e 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em relação ao controle positivo ($p < 0,05$), indicando uma atividade inibitória da NPC. Essa inibição proporcionada pela NPC pode ser oriunda de uma liberação lenta do EEP encapsulado, que permaneceu em contato com as leveduras por mais tempo, conseqüentemente resultando em maior inibição de crescimento (Figura 9).

Figura 9- Avaliação da atividade antifúngica das NPC em comparação com o EEP e NPV pela contagem das UFC's em cepa de (A) *C. albicans* 0546 VITROIDS™, (B) *C. albicans* clínica e (C) *C. glabrata* clínica, leitura em 24 horas de incubação (n=3).

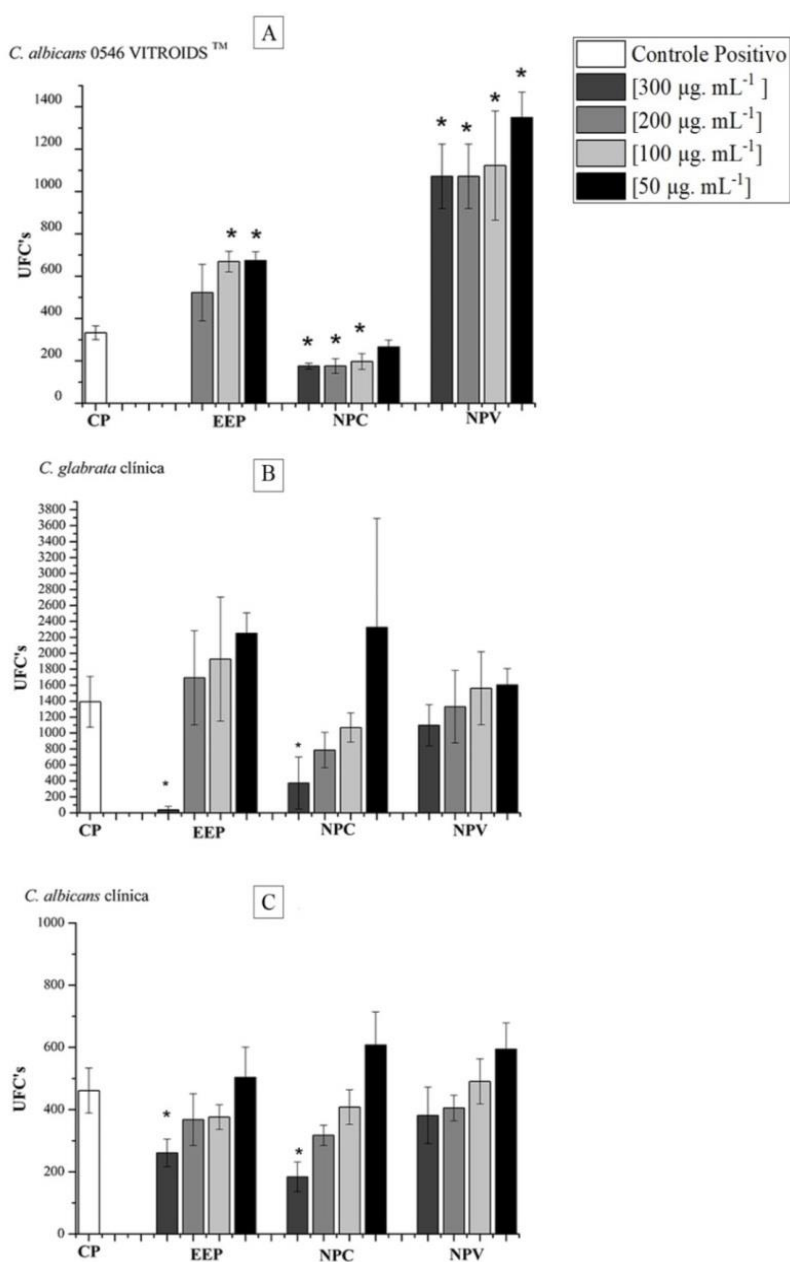
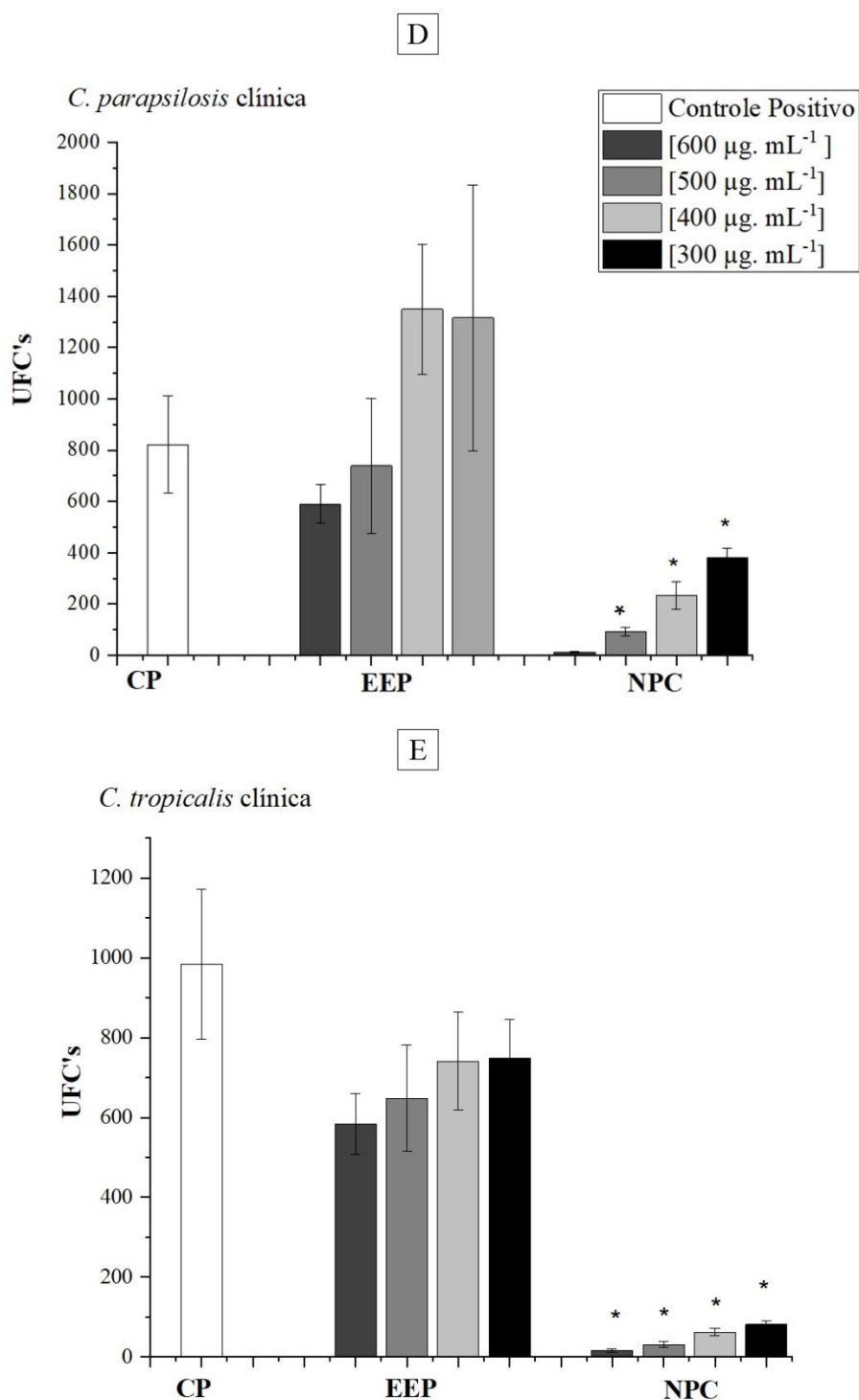


Figura 10- Avaliação da atividade antifúngica das NPC's em comparação com o EEP pela contagem das UFC's em cepa de (D) *C. parapsilosis* clínica e (E) *C. tropicalis* clínica, leitura em 24 horas de incubação (n=3).



Onde: (A) *C. albicans* 0546 VITROIDS™, (B) *C. glabrata* clínica, (C) *C. albicans* clínica, (D) *C. parapsilosis* e (E) *C. tropicalis*. * Diferença estatística, entre a amostra de NPC, EEP e CP, para um nível de confiança de 95% pelo teste ANOVA + pós Tukey ($p < 0,05$).

Quanto às cepas clínicas avaliadas, se observa atividade inibitória apenas nas concentrações de 300 e 600 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, tanto para EEP quanto para NPC. Sugerindo uma concentração com potencial atividade antifúngica. Além disso, observamos que a atividade inibitória do EEP foi similar ao encontrado para a NPC, indicando a preservação dos compostos fenólicos encapsulados na nanoemulsão.

Assim como nesse estudo, Shubharani e colaboradores (2019) também observaram a correlação da atividade antifúngica dose dependentes em NP's de selênio para carreamento de própolis.

O aumento dos casos de resistência antifúngica e a oferta terapêutica limitada trazem a necessidade de novas alternativas terapêuticas. A própolis tem apresentado atividade inibitória em diversos estudos, tornando-se um alvo de interesse para a investigação farmacológica (AFROUZAN et al., 2012; JAYAKUMAR et al., 2012; AWANDEH et al., 2018).

Leveduras de *Candida* spp. estão entre os fungos mais comuns em infecções oportunistas (MONTEIRO & SANTOS, 2019). Sabe-se que há variações entre as cepas de referência e clínicas. Em geral, as cepas clínicas apresentam maiores fatores de resistência e conseqüentemente podem ser menos suscetíveis a testes de sensibilidade (TOBALDINI-VALERIO et al., 2016). Isso pode estar relacionado com as variações encontradas no presente estudo na suscetibilidade entre as cepas aos compostos fenólicos totais do EEP e da NPC.

Diversos estudos relatam a atividade antifúngica do EEP em cepas de *Candida* spp (KHOSRAVI et al., 2013; PIPPI et al., 2015; SZWEDA et al., 2015). Entre eles Dalben-Dota et al (2016) avaliaram a atividade do extrato etanólico em 97 cepas de *C. albicans* e não-*albicans* com concentrações entre 6,14 a 3145,50 mg. mL^{-1} do conteúdo total de flavonoides. Das cepas fúngicas testadas 96,91% apresentaram inibição de crescimento frente ao extrato. Francisco et al (2017) também avaliaram a atividade antifúngica através da microdiluição em caldo do CLSI e observaram que todas as cepas testadas foram suscetíveis ao extrato de própolis.

No estudo de Dota et al (2011) micropartículas foram desenvolvidas pela técnica de *spray-drying* com DM de 4,06 μm e EE% de $78,51 \pm 2,81\%$. As concentrações testadas foram estabelecidas a partir da quantificação de compostos fenólicos totais, em média 696,31 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. 93,26% das leveduras testadas tiveram inibição de crescimento, sendo que cepas de *C. albicans* foram mais suscetíveis à micropartícula contendo o

extrato que cepas não-*albicans*. As concentrações testadas foram próximas às do presente estudo e a menor suscetibilidade das cepas não-*albicans* também foi observada.

NP's poliméricas de PLGA contendo própolis foram desenvolvidas por nanoprecipitação para utilização em selantes dentários e observou-se a partir da avaliação da atividade antifúngica por contato direto atividade inibitória frente a *C. albicans* (ABDEL-RAHEEM et al., 2019).

A partir de evidências da literatura e os resultados encontrados em nosso estudo podemos indicar que os compostos fenólicos presentes nos extratos de própolis podem proporcionar inibição de crescimento em cepas de *Candida* spp, e quando encapsulado a CIM 50% pode ser menor que o extrato livre (SILVA-CARVALHO; BALTAZAR; ALMEIDA-AGUIAR, 2015).

6. 9. Avaliação da citotoxicidade das NP's contendo EEP sobre hemácias

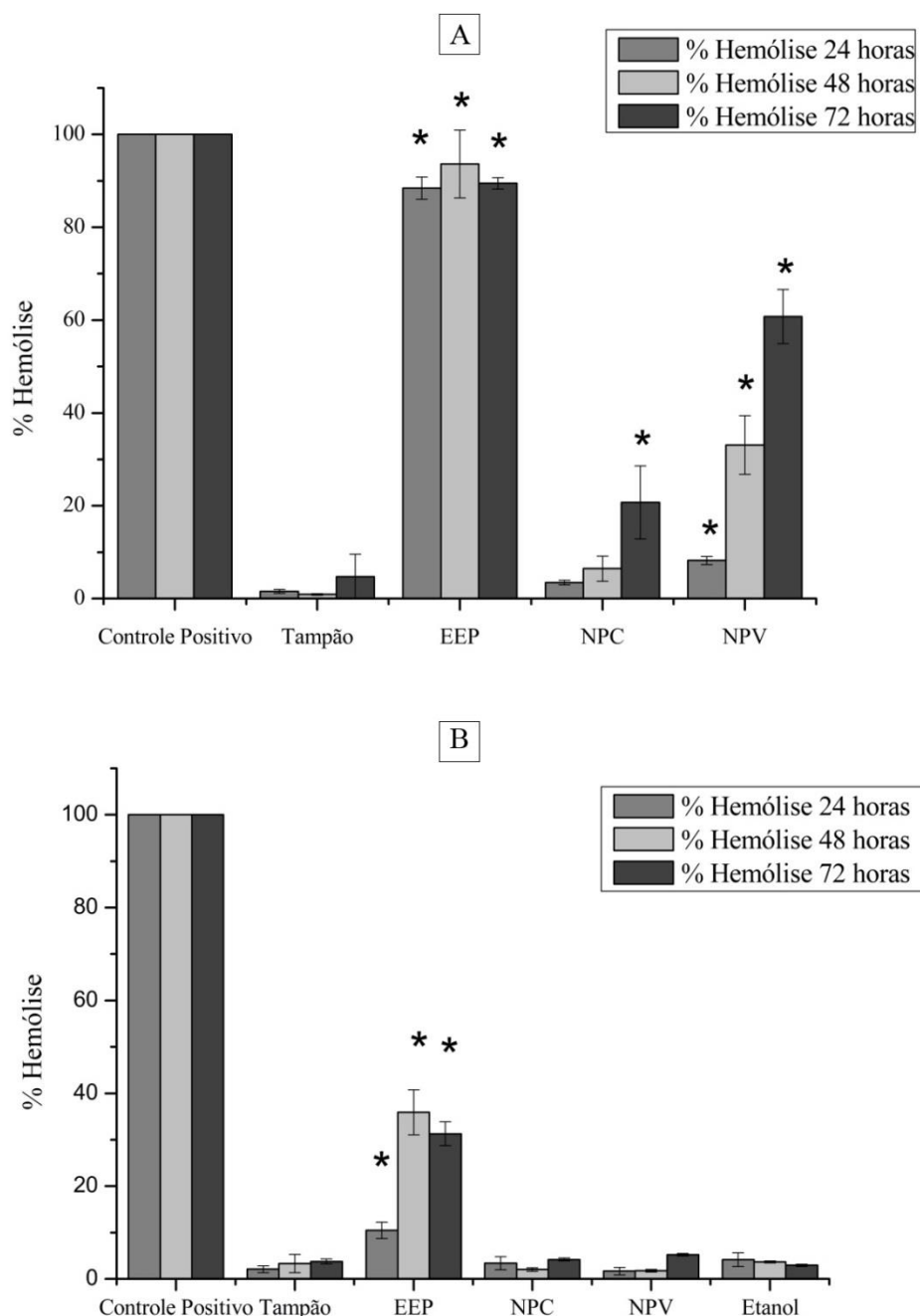
No presente estudo, foram avaliadas duas concentrações do EEP, NPC e NPV. Em todos os intervalos de tempo analisados, não foi possível observar hemólise quando utilizados os solventes etanol e tampão pH 7,4, e dentre as amostras testadas, foi possível observar hemólise após 24, 48 e 72 horas de incubação do ensaio no EEP em ambas as concentrações testadas, para NPC observou-se hemólise apenas na menor concentração testada de 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em 72 horas, enquanto que a NPV apresentou hemólise apenas na concentração de 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ em 24, 48 e 72 horas. Sendo que as NPC's induziram menor atividade hemolítica, uma vez que, sua média foi a mais próxima do valor de absorvância registrado para o controle (tampão pH 7,4) (Figura 11).

Polímeros como a lecitina têm sido utilizados para o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados principalmente por suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade que reduzem o risco de efeitos citotóxicos. O mesmo se refere à busca por moléculas com propriedades biológicas que atendam a estas necessidades (MICHAL; EWA; DAI et al., 2016).

Nesse sentido, avaliações de citotoxicidade são necessárias a estes sistemas desenvolvidos, e tem sido frequente a vias de administração pela via oral (MOCAN et al., 2013). Sendo que o metabolismo resultará em aumento da biodisponibilidade da

molécula na corrente sanguínea, que dependendo da concentração poderá interferir em processos intracelulares (SUKHANOVA et al., 2018; ZHOU et al., 2019). Uma das metodologias utilizadas tem sido a avaliação citotóxica sobre hemácias.

Figura 11- Avaliação da citotoxicidade de EEP, NPC, NPV, além dos controles tampão e etanol sobre hemácias na concentração de e $50 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (A), $200 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (B) incubação de 24 h, 48 h e 72 h.



Onde: os dados rotulados com * são significativamente diferentes da média do controle (tampão) para um nível de confiança de 95% pelo teste ANOVA + pós-teste de Dunnet ($p < 0,05$).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observa-se que a nanoemulsão desenvolvida neste trabalho apresentou características físico-químicas importantes para um sistema de administração oral. Apresentando estabilidade ao longo do tempo, sem variação de DM, IPD e PZ. Além disso, em relação à morfologia obtivemos um sistema esférico, com eficiência de encapsulação elevada e que permitiu determinar a avaliação biológica do sistema frente a cepas de *Candida* spp.

Em ensaios comparados com o EEP, a NPC apresentou desempenho favorável em relação à segurança do sistema frente a hemácias e a atividade antifúngica foi significativamente elevada.

Por ser um sistema biocompatível, biodegradável e com processo de produção de baixo custo e com alto rendimento, nossa nanoemulsão pode ser uma alternativa para carreamento do EEP e potencialização de suas propriedades biológicas.

8. CONCLUSÃO

Portanto, nossos resultados são promissores e inovadores. Uma vez que o sistema foi otimizado com produtos de baixo custo, biodegradáveis e biocompatíveis e apresentou características importantes para um sistema nanoestruturado, com condições ideais de diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta, eficiência de encapsulação e morfologia. Espectros de infravermelho permitiram confirmar a encapsulação do EEP na nanopartícula desenvolvida. E o perfil de liberação em fluido gastrointestinal foi observado de forma sustentada e lenta, característica de um sistema de administração oral.

Além disso, a nanoemulsão apresentou inibição de crescimento frente a cepas fúngicas testadas, podendo ser uma alternativa para o carreamento de EEP com finalidade antifúngica. A nanoemulsão foi desenvolvida ainda com componentes que favoreceram a estabilidade do sistema e a viabilidade celular observada em hemácias.

Estudos futuros de farmacocinética e avaliação biológica *in vivo* são importantes para estabelecer parâmetros de biodisponibilidade e eficácia terapêutica de modo a contribuir com os resultados encontrados em nosso trabalho.

9. REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHEEM, I. A; ABDUL-RAZEK, A; ELGENDY, A. A; SALEH, N. M; SHAABAN, M. I; ABD-EL-HADY, F. K. Design, evaluation and antimicrobial activity of Egyptian propolis-loaded nanoparticles: intrinsic role as a novel and naturally based root canal nanosealer. **Int J Nanomedicine**, v. 14, p. 8379-8398, 2019.
- ABREU, A. P. L. **Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, p. 1-71, 2008.
- ADOMAVICIUTE, E; STANYS, S; ZILIUS, M; JUSKKAITE, V; PAVILONIS, A; BRIEDIS, V. Formation and Biopharmaceutical Characterization of Electrospun PVP Mats with Propolis and Silver Nanoparticles for Fast Releasing Wound Dressing. **Biomed Research International**, p. 1-11, 2016.
- AFROUZAN, H; AMIRINIA, C; MIRHADI, S. A; EBADOLLAHI, A; VASEJI, N; TAHMASBI, G. Evaluation of antimicrobial activity of propolis and nanopropolis against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, **African Journal of Microbiology Research**, 6 (2): 421- 425, 2012.
- AFROUZAN, H; TAHHIGHI, A; ZAKERI, S; ES-HAGHI, A. Chemical composition and antimicrobial activities of Iranian Propolis. **Iranian Biomedical Journal**, 22 (1): 50-65, 2018.
- AGÜERO, M. B; SVETAZ, L; BARONI, V; LIMA, B; LUNA, L; ZACCHINO, S; SAAVEDRA, P; WUNDERLIN, D; FERESIN, G. E; TAPIA, A. Urban propolis from San Juan province (Argentina): ethnopharmacological uses and antifungal activity against *Candida* and dermatophytes. **Industrial Crops and products**, 57, 166- 173, 2014.
- AHMAD, A; SYED, H. W. F; TAHIR, K; TAJ, R; KHAN, A. U; HAMEED, M. U; YUAN, Q. Amphotericin B – conjugated biogenic silver nanoparticles as an innovative strategy for fungal infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 271-281, 2016.
- AHMAD, N; AHMAD, R; ABBAS-NAQVI, A; ASHAFAG, M; ALAM, M. A; AHMAD, F. J; AL-GHAMDI, M. S. The effect of safranal loaded mucoadhesive nanoemulsion on oxidative stress markers in cerebral ischemia. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 45, n. 4, p. 775-787, 2017.
- AHMAD, N; AHMAD, R; NAQVI, A. A; ALAM, M. A; ASHAFAG, M; ABDUR-RUB, R; AHMAD, F. J. Intranasal delivery of quercetin-loaded mucoadhesive nanoemulsion for treatment of cerebral ischaemia. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 46, n. 4, p. 717-729, 2018.
- AHMADITABAR, P; MOMTAZI-BOROJENI, A. A; REZAYAN, A. H; MAHMOODI, M; SAHEBKAR, A; MELLAT, M. Enhanced entrapment and improved *in vitro* controlled release of N-Acetyl Cysteine in hybrid PLGA/Lecithin nanoparticles prepared using a nanoprecipitation/self-assembly method. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 12, p. 4203-4209, 2017.
- AKYOL, S; GINIS, G. O. Z; ARMUTCU, F; YIGITOGLU, R. M; AKYOL, O. *In vivo* and *in vitro* antineoplastic actions of caffeic acid phenetyl ester (CAPE): therapeutic perspectives. **Nutrition and cancer**, v. 65, n. 4, p. 515-526, 2013.
- ALAM, P; ANSARI, M. J; ANWER, M. K; RAISH, M; KAMAL, Y. K; SHAKEEL, F. Wound healing effects of nanoemulsion containing clove essential oil. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 45, n. 3, p. 591-597, 2017.

AL-ANI, I; ZIMMERMANN, S; REICHLING, J; WINK, M. Antimicrobial activities of european propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. **Medicines**, v. 5, n. 2, p. 1- 17, 2018.

ALI, A; ANSARI, V. A; AHMAD, U; AKHTAR, J; JAHAN, A. Nanoemulsion: an advanced vehicle for eficiente drug delivery. **Drug Res**, v. 67, n. 11, p. 617-631, 2017.

ALKHATIB, M. H; ALSHEHRI, W. S; ABDU, F. B. *In vivo* evaluation of the anticancer activity of the Gemcitabine and Doxorubicin combined in a nanoemulsion. **J Pharm Bioallied Sci**, v. 10, n. 1, p. 35-42, 2018.

ALMANSOUR, M. J; ALFERAH, M. A; JARRAR, B. M. Protetive role of propolis against histological alterations in renal tissue induced by gold nanoparticles. **Science Asia**, 42, 340 – 345, 2016.

AL-REMAWI, M; ELSAYED, A; MAGHRABI, I; HAMAI, M; JABER, N. Chitosan/lecithin liposomal nanovesicles as an oral insulin delivery system. **Pharm Dev Technol**, v. 22, n. 3, p. 390-398, 2017.

ANDRADE, J. K. S; DENADAI, M; 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 Res Int**, v. 101, p. 129-138, 2017.

ANJUM, S. I; ULLAH, A; KHAN, K. A; ATTAULLAH, M; KHAN, H; BASHIR, M. A; TAHIR, M; ANSARI, M. J; GHRAMH, H. A; ADGABA, N; DASH, C. K. Composition and functional properties of propolis (bee glue): a review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.013>.

ANTON, N; BENOIT, J. P; SAULNIER. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates- A review. **J Control Release**, v. 128, p. 185-199, 2008.

ARAF, M. G; GHALWASH, D; EL-KERSH, D. M; ELMAZAR, M. M. Propolis-based niosomes as oromucoadhesive films: a randomized clinical trial of a therapeutic drug delivery platform for the treatment of oral recurrent aphthous ulcers. **Scientific Reports**, v. 8, n. 18056, 2018.

ARBAIN, N. H; SALIM, N; MASOUMI, H. R. F; WONG, T. W; BASRI, M; ABDULRAHMAN, M. B. *In vitro* evaluation of the inhalable quercetin loaded nanoemulsion for pulmonar delivery. **Drug Deliv Transl Res**, v. 9, n. 2, p. 497-507, 2019.

ARMSTRONG, A. W; TAYLOR, C. R. **Farmacologia das Infecções Fúngicas**. In: GOLAN, D. E. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

ASKARI, V. R; RAHIMI, V. B; ZAMARI, P; FERAYDOUNI, N; RAHMANIAN-DEVIN, P; SAHEBKAR, A. H; RAKHSHANDEH, H. Evaluation of the effects of Iranian propolis on the severity of post operational- induced peritoneal adhesion in rats. **Biomed Pharmacother**, v. 99, p. 346-353, 2018.

AVANÇO, G. B; BRUSCHI, M. L. Preparation and characterization of ethylcellulose microparticles containing propolis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 129-135, 2008.

AWAWDEH, L; JAMLEH, A; BEITAWI, M. A. The antifungal effect of propolis endodontic irrigant with three other irrigation solutions in presence and absence of smear layer: an *in vitro* study. **Iran Endod J**, v. 13, n. 2, p. 234-239, 2018.

- BAKER, S; THOMSON, N; WEILL, F. X; HOLT, K. E. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. **Science**, 360, 733-738, 2017.
- BALTAS, N; KARAOGLU, S. A; TARAKCI, C; KOLAYLIS, S. Effect of propolis in gastric disorders: inhibition studies on the growth of *Helicobacter pylori* and production of its urease. **J Enzyme Inhib Med Chem**, p. 1-15, 2016.
- BARBOSA, V. T; SOUZA, J. K. C; ALVINO, V; MENEGHETTI, M. R; FLOREZ-RODRIGUEZ, P. P; MOREIRA, R. E; PAULINO, G. V. B; LANDELL, M. F; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D; NASCIMENTO, T. G; GRILLO, L. A. M; DORNELAS, C. B. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using brazilian propolis. **Biotechnol Prog**, v. 35, n. 6, p. 2888, 2019.
- BARTH, O. M; FREITAS, A. S; MATSUDA, A. H; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Botanical origin and Artepillin – C content of Brazilian Propolis samples. **Grana**, v. 52, n. 2, p. 129-135, 2013.
- BAYGAR, T. Characterization of silk sutures coated with propolis and biogenic silver nanoparticles (AgNPs); an eco-friendly solution with wound healing potential against surgical site infections (SSIs). **Turk J Med Sci**, 2019.
- BERHET, M; GAUTHIER, Y; LACROIX, C; VERRIER, B; MONGE, C. Nanoparticle-based dressing: the future of wound treatment? **Trends Biotechnol**, v. 35, n. 8, p. 770-784, 2017.
- BITTENCOURT, M. L. F; RIBEIRO, P. R; FRANCO, R. L. P; HILHORST, H. W. M; CASTRO, R. D; FERNANDEZ, L. G. Metabolic profiling, antioxidant and antibacterial activities of brazilian propolis: use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 79, n. 3, p. 449-457, 2015.
- BOCHE, M; POKHARKAR, V. Quetiapine nanoemulsion for intranasal drug delivery: evaluation of brain-targeting efficiency. **AAPS PharmSciTech**, v. 18, n. 3, p. 686-696, 2017.
- BONFERONI, M. C; ROSSI, S; SANDRI, G; FERRARI, F; GAVINI, E; RASSU, G; GIUCHEDI, P. Nanoemulsions for “Nose-to-Brain” drug delivery. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, 2019. doi: 10.3390/pharmaceutics11020084.
- BOONSAI, P; PHUWAPRAISIRISAN, P; CHANCHAO, C. Antibacterial activity of a cardanol from Thai *Apis mellifera* propolis. **Int J Med Sci**, v. 11, p. 327- 336, 2014.
- BRYAN, J; REDDEN, P; TRABALHA, C. The mechanism of action of Russian propolis etanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 192-198, 2015.
- BUTNARIU, M. V; GIUCHICI, C. V. The use of some nanoemulsions based on aqueous propolis and lycopene extract in the skin’s protective mechanisms against UVA radiation. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 3, 2011.
- CARBONI, E; TSCHUDI, K; NAM, J; LU, X; MA, A. W. Particle margination and its implications on intravenous anticancer drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 3, p. 762-71, 2014.
- CARRILLO, C; CAVIA-MDEL, M; ALONSO-TORRE, S. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action; a review. **Nutr Hosp**, v. 27, n. 4, p. 978-990, 2012.
- CARVALHO, A. A; FINGER, D; MACHADO, C. S; SCHMIDT, E. M; COSTA, P. M; ALVES, A. P. N. N; MORAIS, T. M. F; QUEIROZ, M. G. R; QUINÁIA, S. P; ROSA, M. R;

SANTOS, J. M. T; PESSOA, C; MORAES, M. O; COSTA-LOTUFO, L. V; SAWAYA, A. C. H. F; EBERLIN, M. N; TORRES, Y. R. *In vivo* antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1239-1245, 2011.

CARVALHO, P. M; FELÍCIO, M. R; SANTOS, N. C; GONÇALVES, S; DOMINGUES, M. M. Application of Light Scattering Techniques to nanoparticle characterization and development. **Front Chem**, v. 6, p. 237, 2018. Doi: 10.3389/fchem.2018.00237

CASA, D. M; SCARIOT, D. B; KHALIL, N. M; NAKAMURA, C. V; MAINARDES, R. M. Bovine serum albumin nanoparticles containing amphotericin B were effective in treating murine cutaneous leishmaniasis and reduced the drug toxicity. **Exp Parasitol**, v. 192, p. 12-18, 2018. Doi: 10.1016/j.exppara.2018.07.003

CHEN, B. H; INBARAJ, B. S. Nanoemulsion and nanoliposome based strategies for improving anthocyanin stability and bioavailability. **Nutrients**, v. 11, n. 5, 2019.

CHEN, J; ZHENG, J; MCCLEMENTS, D. J; XIAO, H. Targeretin-loaded protein nanoparticles fabricated from zein/B-lactoglobulin: preparation, characterization, and functional performance. **Food Chemistry**, v. 158, p. 466-472, 2014

CHEN, L. C; CHEN, Y. C; SU, C. Y; WONG, W. P; SHEU, M. T; HO, H. O. Development and characterization of lecithin-based self-assembling mixed polymeric micellar (saMPSMs) drug delivery systems for curcumin. **Sci Rep**, v. 6, p. 37122, 2016.

CHEN, X; CHENG, X; SOERİYADI, A. H; SAGNELLA, S. M; LU, X; SCOTT, J. A; LOWE, S. B; KAVALLARIS, M; GOODING, J. J. Stimuli-responsive functionalized mesoporous silica nanoparticles for drug release in response to various biological stimuli. **Biomater Sci**, v. 2, p. 121-130, 2014.

CHEN, Y. W; YE, S. R; TING, C; YU, Y. H. Antibacterial activity of propolis from Taiwanese green propolis. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 2, p. 761-768, 2017.

CHHONKER, Y. S; PRASAD, Y. D; CHANDASANA, H; VISHVKARMA, A; MITRA, K; SHUKLA, P. K; BHATTA, R. S. Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. **Int J Biol Macromol**, v. 72, p. 1451-8, 2015. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.10.014.

CHOUDHURY, H; GORAIN, B; CHATTERJEE, B; MANDAL, U. K; SENGUPTA, P; TEKADE, R. K. Pharmacokinetic and pharmacodynamics features of nanoemulsion following oral, intravenous, topical and nasal route. **Curr Pharm Des**, v. 23, n. 17, p. 2504-2531, 2017.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras**; Norma Aprovada—Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

CORNARA, L; BIAGI, M; XIAO, J; BURLANDO, B. Therapeutic properties of bioactive compounds from diferente honeybee products. **Front Pharmacol**, v. 8, p. 1-20, 2017.

CORTÉS-HIGAREDA, M; LORENA-RAMOS-GARCÍA, M; CORREA-PACHECO, Z. N; DEL-RÍO-GARCÍA, J. C; BAUTISTA-BAÑOS, S. Nanostructured chitosan/propolis formulations: characterization and effect on the growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins. **Heliyon**, v. 5, n. 5, 2019. Doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01776.

COSTA, A. F; ARAUJO, D. E; CABRAL, M. S; BRITO, I. T; LEITE, L. B. M; PEREIRA, M; AMARAL, A. C. Development, characterization, and *in vitro in vivo* evaluation of polymeric nanoparticles containing miconazole and farnesol for treatment of vulvovaginal candidiasis. **Med Mycol**, v. 57, n. 1, p. 52-62, 2018.

CUI, Z; QIU, F; SLOAT, B. R. Lecithin-based cationic nanoparticles as a potential DNA delivery system. **Int J Pharm**, v. 313, n. 1-2, p. 206-213, 2006.

DAI, L; SUN, C; WANG, D; GAO, Y. The interaction between zein and lecithin in ethanol-water solution and characterization of zein-lecithin composite colloidal nanoparticles. **PLoS One**, v. 11, n. 11, 2016. Doi: 10.1371/journal.pone.0167172

DALBEN-DOTA, K. F; FARIA, M. G; BRUSCHI, M. L; PELLOSO, S. M; LOPES-CONSOLARO, M. E; SVIDZINSKI, T. I. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from vaginal exudates. **J Altern Complement Med**, v. 16, n. 3, p. 285-290, 2010.

DANESHMAND, S; GOLMOHAMMADZADEH, S; JAAFARI, M. R; MOVAFFAGH, J; REZAEI, M; SAHEBKAR, A; MALAEKEH-NIKOUEI, B. Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization. **J Cell Biochem**, v. 119, n. 6, p. 4251-4264, 2018.

DEEGAN, K. R; FONSECA, M. S; OLIVEIRA, D. C. P; SANTOS, L. M; FERNANDEZ, C. C; HANNA, S. A; MACHADO, B. A. S; UMSZA-GUEZ, M. A; MEYER, R; PORTELA, R. W. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* clinical isolates to allopathic antifungals and Brazilian Red, Green, and Brown Propolis Extracts. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, 2019.

DEL-CARPIO-PEROCHENA, A; KISHEN, A; FELITTI, R; BHAGIRATH, A. Y; MEDAPATI, M. R; LAI, C; CUNHA, R. S. Antibacterial properties of chitosan nanoparticles and propolis associated with calcium hydroxide against single – and multispecies biofilms: an *in vitro* and *in situ* study. **J. Endod**, v. 43, n. 8, p. 1332-1336, 2017.

DENISOW, B; DENIZOW-PIETRZYK, M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. **J Sci Food Agric**, v. 96, n. 13, p. 4303-4309, 2016.

DEVEQUI-NUNES, D; MACHADO, B. A. S; BARRETO, G. A; SILVA, J. R; SILVA, D. F; ROCHA, J. L. C; BRANDÃO, H. N; BORGES, V. M; UMSZA-GUEZ, M. A. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. **PLOS ONE**, 2018. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207676>.

DI-BELLO, M. P; BLOISE, E; MAZZETTO, S. E; MELE, G. Formulation and chemical stability in aqueous media of Cannabidiol embedded in Cardanol-based nanovesicles. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 5, n. 10, p. 8870-8875, 2017.

DOTA, K. F. D; CONSOLARO, M. E. L; SUIDZINSKI, T. I. E; BRUSCHI, M. L. Antifungal activity of brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 1-8, 2011. Doi: 10.1093/ecam/neq029

DRIGLA, F; BALACESCU, O; VISAN, S; BISBOACA, S. E. BERINDAN-NEAGOE, J; MARGHITAS, L. A. Synergistic effects induced by combined treatments of aqueous extract of propolis and venon. **CLUJUL Medical**, v. 89, n. 1, p. 104-109, 2016.

DUKOVSKI, B. J; PLANTIC, I; CUNCIC, I; KRTALIC, I; JURETIC, M; PEPIC, I; LOVRIC, J; HAFNER, A. Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery. **Int J Pharm**, v. 533, n. 2, p. 480-487, 2017.

EDRIS, A. E. Formulation and shelf life stability of water-borne lecithin nanoparticles for potential application in dietary supplements field. **J Diet Suppl**, v. 9, n. 3, p. 211-22, 2012.

ELBAZ, N. M; KHALIL, I. A; RABON, A. A; EL-SHERBINY, I. M. Chitosan – Based nano in microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of Propolis. **Inter Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 254- 269, 2016.

EL-GUENDOUCZ, S; AAZZA, S; LYOUSSI, B; MAJDOUB, N; BANKOVA, V; POPOVA, M; RAPOSO, S; ANTUNES, M. D; MIGUEL, M. G. Effect of poplar-type propolis on oxidative stability and rheological properties of O/W emulsions. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 8, p. 1073-1082, 2018.

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

ESPADA, R; VALDESPINA, S; AFFONSO, C; RIVAS, G; BALLESTEROS, M. P; TORRADO, J. J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. **Int J Pharm**, v. 361, n. 1-2, p. 64-9, 2008.

FAN, Y; MA, L; ZHANG, W; WANG, J; CHEN, Y; GAO, Y; FENG, W; ZHONG, L; SONG, X. The design of propolis flavone microemulsion and its effect on enhancing the immunity and antioxidant activity in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 65, p. 200-207, 2014.

FAYEZI, S; LEROY, J. L. M. R; GHAFFARI-NOVIN, M; DARABI, M. Oleic acid in the modulation of oocyte and preimplantation embryo development. **Zygote**, v. 26, n. 1, p. 1-13, 2018.

FERNANDEZ, C. A; EVANGELISTA, A. D; SANTOS, C. M; TELES, B. I; BORGES, M. L. L; PEREIRA, M; CORREA, A. A. Development, characterization, and *in vitro-in vivo* evaluation of polymeric nanoparticles containing miconazole and farnesol for treatment of vulvovaginal candidiasis. **Med Mycol**, p. 1-11, 2018.

FERREIRA, S. B. S; DIAS, B. R. A; OBREGÓN, C. S; GOMES, C. C; PEREIRA, R. R. A; GODOY, J. S. R; SVIDZINSKI, T. I. E. Microparticles containing propolis and metronidazole: in vitro characterization, release study and antimicrobial activity against periodontal pathogens. **Pharm Dev Tech**, v. 19, n. 2, p. 173-180, 2014.

FINSY, R.; JAEGER, N. Particle Sizing by Photon Correlation Spectroscopy. Part II: Average values. **Particle & Particle Systems Characterization**, v.8, n.1-4, p.187-93, 1991.

FOKT, H; PEREIRA, A; FERREIRA, A. M; CUNHA, A; AGUIAR, C. How do bees prevent have infections? The antimicrobial properties of propolis. **Current Research, Tecnology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 1, p. 481-493, 2010.

FOLIN, O; DENIS, W. On phosphotungstic- phosphomolybdic compounds as color reagents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 12, p. 239-2143, 1912.

FONTANA, A; SPOLAORE, B; POLVERINO-DE-LAURETO, P. The biological activities of protein/oleic acid complexes reside in the fatty acid. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 6, p. 1125-1143, 2013.

FRANCHIN, M; CÓLON, D. F; CASTANHEIRA, F. V. S; CUNHA, M. G; BUENO-SILVA, B; ALENCAR, S. M; CUNHA, T. M; ROSALEN, P. L. Vestitol isolated from Brazilian Red Propolis inhibits neutrophils migration in the inflammatory process: elucidation of the mechanism of action. **J Nat Prod**, v. 79, n. 4, p. 954-960, 2016.

FRANCISCO, L; PINTO, D; ROSSETO, H; TOLEDO, L; SANTOS, R; TOBALDINI-VALÉRIO, F; SVIDZINSKI, T; BRUSCHI, M; SARMENTO, B; OLIVEIRA, M. B; RODRIGUES, F. Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of brazilian propolis by product. **Food Research International**, v. 105, p. 537-547, 2017.

FREIRES, I. A; QUEIROZ, V. C. P. P; FURLETTI, V. F; IKEGAKI, M; ALENCAR, S. M; DUARTE, M. C. T; ROSALEN, P. L. Chemical composition and antifungal potential of brazilian propolis against *Candida* spp. **J Micol Méd**, 2016.

GALÁN-ARRIERO, I; SERRANO-MUÑOZ, D; GÓMEZ-SORIANO, J; GOICOECHEA, C; TAYLOR, J; VELASCO, A; ÁVILLA-MARTÍN, G. The role of omega-3 and omega-9 fatty acids for the treatment of neuropathic pain after neurotrauma. **Biochim Biophys Acta Biomembr**, v. 1859, n. 9 pt b, p. 1629-1635, 2017.

GANTA, S; TALEKAR, M; SINGH, A; COLEMAN, T. P; AMIJI, M. M. Nanoemulsions in translational research-opportunities and challenges in targeted cancer therapy. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 3, p. 694-708, 2014.

GATEA, F; TEODOR, E. D; SECIU, A. M; COVACI, O. I; MANOIU, S; LAZAR, V; RADU, G. L. Antitumour, antimicrobial and catalytic activity of gold nanoparticles synthesized by different pH propolis extracts. **J. Nanopart Res**, v. 17, p. 320, 2015.

GHIASI, Z; ESMAELI, F; AGHJANI, M; CHAZI-KHANSARI, M; FARAMARZI, M. A; AMANI, A. Enhancing analgesic and anti-inflammatory effects of capsaicin when loaded into olive oil nanoemulsion: an *in vivo* study. **Int J Pharm**, v. 559, p. 341-347, 2019.

GIBALDI, M.; FELDMAN, S. Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations. Theoretical considerations and application to nondisintegrating dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 56, n. 10, p. 1238 -1242, 1967.

GRANGE, J. M; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, p. 159-160, 1990.

GUIMARÃES, N. S. S; MELLO, J. C; PAIVA, J. S; BUENO, P. C. P; BERRETA, A. A; TORQUATO, R. J; NANTES, J. L; RODRIGUES, T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. **Food and Chemical and Toxicology**, v. 50, p. 1091-1097, 2012.

GUPTA, A; ERAL, H. B; HATTON, T. A; DOYLE, P. S. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016.

HAFNER, A; LOVRIC, J; PEPIC, I; FILIPOVIC-GRCIC, J. Lecithin/chitosan nanoparticles for transdermal delivery of melatonin. **J Microencap**, v. 28, n. 8, p. 807-815, 2011.

- HARUN, S. N; NORDIN, S. A; GANI, S. S. A; SHAMSUDDIN, A. F; BASRI, M; BASRI, H. B. Development of nanoemulsion for efficient brain parenteral delivery of cefuroxime: designs, characterizations, and pharmacokinetics. **Int J Nanomedicine**, v. 13, p. 2571-2584, 2018.
- HONG, K; HAN, D; LI, M. X; ZHANG, P; LIU, C. G. Development and validation of an ultraviolet-visible spectrophotometric method for determination of phenylethyl resorcinol in new topical nanoemulsions. **Int J Cosmet Sci**, v. 39, n. 3, p. 337-343, 2017.
- HÖRMANN, K; ZIMMER, A. Drug delivery and drug targeting with parenteral lipid nanoemulsions-A review. **J Control Release**, v. 223, p. 85-98, 2016.
- HOSSEINI, S. F; REZAEI, M; ZANDI, M; FARAHMANDGHAHI, F. Development of bioactive fish gelatin/chitosan nanoparticles composite films with antimicrobial properties. **Food Chem**, v. 194, p. 1266-1274, 2016. Doi: 10.1016/j.foodchem.2015.09.004
- HU, X. B; TANG, T. T; LI, Y. J; WU, J. Y; WANG, J. M; LIU, X. Y; XIANG, D. X. Phospholipid complex based nanoemulsion system for oral insulin delivery: preparation, *in vitro*, and *in vivo* evaluations. **Int J Nanomedicine**, v. 14, p. 3055-3067, 2019.
- HUANG, S; ZHANG, C. P; WANG, K; LI, G. Q; HU, F. L. Recent advances in the chemical composition of propolis. **Molecules**, v. 19, p. 1-23, 2014.
- HUBBS, A. F; SARGENT, L. M; PORTER, D. W; SAGER, T. M; CHEN, B. T; FRAZER, D. G; CASTRANOVA, V; SRIRAM, K; NURKIEWICZ, T. R; REYNOLDS, S. H; BATTELLI, L. A; SCHWEGLER-BERRY, D; MCKINNEY, W; FLUHARTY, K. L; MERCER, R. R. Nanotechnology: **Toxicologic Pathologic**, v. 41, n. 2, p. 395- 409, 2013.
- IADNUT, A; MAMOON, K; THAMMASIT, P; PAWICHAI, S; TIMA, S; PREECHASUTH, K; KAEWKOD, T; TRAGOOLPUA, Y; TRAGOOLPUA, K. *In vitro* antifungal and antivirulence activities of biologically synthesized ethanolic extract of propolis-loaded PLGA nanoparticles against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-14, 2019.
- INUI, S; HATANO, A; YOSHINO, M; HOSOYA, T; SHIMAMURA, Y; MASUDA, S; AHN, M. R; TAZAWA, S; ARAKI, Y; KUMAZAWA, S. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. **Nat Prod Res**, v. 28, n. 16, p. 1293-1296, 2014.
- JAISWAL, M; DUDHE, R; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**, v. 5, n. 2, p. 123-127, 2015.
- JARDIM, K. V; SIQUEIRA, J. L. N; BÁO, S. N; SOUSA, M. H; PARIZE, A. L. The role of the lecithin addition in the properties and cytotoxic activity of chitosan and chondroitin sulfate nanoparticles containing curcumin. **Carbohydrate Polymers**, v. 227, p. 115351, 2020.
- JASMINA, H; DZANA, O; ALISA, E; EDINA, V; OGNJENKA, R. Preparation of nanoemulsions by high-energy and lowenergy emulsification methods. **CMBEBIH**, p. 317-322, 2017.
- JAVED, I; HUSSAIN, S. Z; SHAHZAD, A; KHAN, J. M; UR-REHMAN, H; REHMAN, M; USMAN, F; RAZI, M. T; SHAH, M. R; HUSSAIN, I. Lecithin-gold hybrid nanocarriers as efficient and pH selective vehicles for oral delivery of diacerein-in-vitro and in-vivo study. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 141, p. 1-9, 2016.

JAYAKUMAR, R; RAMYA, C; KUMAR, P. T. S; SNIMA, K. S; LAKSHMANAN, V. K; NAIR, S. V. *In vitro* anti-cancerous and anti-microbial activity of propolis nanoparticles. **J Nanopharm Drug Delivery**, v. 1, p. 1- 7, 2012.

JEMAA, M. B; FALLEH, H; KSOURI, R. Encapsulation of natural bioactive compounds: nanoemulsion formulation to enhance essential oils activities. **IntechOpen**, 2019. Doi: 10.5772/intechopen.84183.

JIN, X; ZHANG, Z. H; SUN, E; TAN, X. B; ZHU, F. X; JIA, X. B. A novel drug-phospholipid complex loaded micelle for baohuoside I enhanced oral absorption: *in vivo* and *in vitro* evaluations. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 39, n. 9, p. 1421-30, 2013.

KALEPU, S; NAKKANTI, V. Improved delivery of poorly soluble compounds using nanoparticle technology: a review. **Drug Deliv Transl Res**, v. 6, n. 3, p. 319-32, 2016.

KAUR, K; KAUR, J; KUMAR, R; MEHTA, S. K. Formulation and physiochemical study of α -tocopherol based oil in water nanoemulsion stabilized with non toxic, biodegradable surfactant: sodium stearyl lactate. **Ultrason Sonochem**, v. 38, p. 570-578, 2017.

KAUSHIK, L; SRIVASTAVA, S; PANJETA, A; CHAUDHARI, D; GHADI, R; KUCHE, K; MALIK, R; PREET, S; JAIN, S; RAZA, K. Exploration of docetaxel palmitate and its solid lipid nanoparticles as a novel option for alleviating the rising concern of multi-drug resistance. **Int J Pharm**, v. 119088, 2020.

KAZEMI, F; DIVSALAR, A; SABOURY, A. A. Structural analysis of the interation between free, glycated and fructated hemoglobina with propolis nanoparticles: a spectroscopic study. **International J Biol Macromol**, p. 1-9, 2017.

KELLY, H. G; KENT, S. J; WHEATLEY, A. K. Immunological basis for enhanced immunity of nanoparticle vaccines. **Expert Rev Vaccines**, v. 18, n. 3, p. 269-280, 2019.

KHAN, I; SAEED, K; KHAN, I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. **Arabian J Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.

KHOSRAVI, A. R; SHOKRI, H; NIKAEIN, D; MANSOURI, P; ERFAMANESH, A; CHALANGARI, R; KATALIN, M. Yeasts as important agents of onychomycosis: *in vitro* activity of propolis against yeasts isolated from patients with nail infection. **J Altern Complement Med**, v. 19, n. 1, p. 57-62, 2013.

KLANG, V; VALENTA, C. Lecithin-based nanoemulsions. **J Drug Del Sci Tech**, v. 21, n. 1, p. 55-76, 2011.

KLARIC, I; PAVIC, M; MISKULIN, I; BLAZICEVIC, V; DUMIC, A; MISKULIN, M. Influence of dietary supplementation of propolis and bee pollen on liver pathology in broiler chickens. **Animals**, v. 8, n. 54, p. 1-10, 2018.

KUMARI, A; YADAV, S. K; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

LI, J; WANG, X; ZHANG, T; WANG, C; HUANG, Z; LUO, X; DENG, Y. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. **Asian J Pharmaceutical Scien**, v. 10, n. 2, p. 81-98, 2015.

LIN, H. P; JIANG, S. S; CHUU, C. P. Caffeic acid phenethyl ester causes p21 induction, AKT signaling reduction, and growth inhibition in PC-3 human prostate cancer cells. **PLOS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1-12, 2012.

LIU, L; ZHOU, C; XIA, X; LIU, Y. Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: preparation and functional evaluation. **Int J Nanomedicine**, v. 11, p. 761-9, 2016.

LLK, S; SAGLAM, N; ÖZGEN, M. Kaempferol loaded lecithin/chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and their potential applications as a sustainable antifungal agent. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 45, n. 5, p. 907-916, 2017.

LOU, Z; LETSIDI, K. S; YU, F; PEI, Z; WANG, H; LETSIDIDI, R. Inhibitive effect of eugenol and its nanoemulsion on quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **J Food Prot**, v. 82, n. 3, p. 379-389, 2019.

LU, X. Y; WU, D. C; LI, Z. J; CHEN, G. Q. Polymer nanoparticles. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 104, p. 299-323, 2011.

MA, Y; LI, H; GUAN, S. Enhancement of the oral bioavailability of breviscapine by nanoemulsion drug delivery system. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 41, n. 2, p. 177-82, 2015.

MACHADO, J. L; ASSUNÇÃO, A. K. M; SILVA, M. C. P; REIS, A. S; COSTA, G. C; ARRUDA, D. S; ROCHA, B. A; VAZ, M. M. O. L. L; PAES, A. M. A; GUERRA, R. N. M; BERRETA, A. A; NASCIMENTO, F. R. F. Brazilian green propolis: anti-inflammatory property by na immunomodulatory activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2012.

McCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion-based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: nutraceuticals and pharmaceuticals. **Ther Deliv**, v. 4, n. 7, p. 841-857, 2013.

MEMAR, M. Y; GHOTASLOU, R; SAMIEI, M; ADIBKIA, K. Antimicrobial use of reative oxygen terapy: current insights. **Infect Drug Resist**, v. 11, p. 567- 576, 2018.

MICHAL, W; EWA, D; TOMASZ, C. Lecithin-based wet chemical precipitation of hydroxyapatite nanoparticles. **Colloid Polym Sci**, v. 293, n. 5, p. 1561-1568, 2015.

MIGUEL, M. G; NUNES, S; DANDLEN, S. A; CAVACO, A. M; ANTUNES, M. D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extract of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3418-3423, 2010.

MILLER, T; BREYER, S; VAN-COLEN, G; MIER, W; HABERKORN, U; GEISSLER, S; VOSS, S; WEIGANDT, M; GOEPFERICH, A. Premature drug release of polymeric micelles and its effects on tumor targeting. **Int J Pharm**, v. 445, n. 1-2, p. 117-124, 2013.

MOCANU, A; ISOPENCU, G; BUSUIOC, C; POPA, O. M; DIETRICH, P; SOCACIU-SIEBERT, L. Bacterial celulose filmes with ZnO nanoparticles and propolis extracts: synergistic antimicrobial effect. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 17687, 2019.

MOCAN, T. Hemolysis as expression of nanoparticles-induced cytotoxicity in red blood cells. **Biotechnology, Molecular and Nanomedicine**, v. 1, n. 1, p. 7-12, 2013.

MODARRES-GHEISARI, S. M. M; GAVAGSAZ-GHOACHANI, R; MALAKI, M; SAFARPOUR, P; ZANDI, M. Ultrasonic nano-emulsification- A review. **Ultrason Sonochem**, v. 52, p. 52-88, 2019.

MONTEIRO, C. A; SANTOS, J. R. A. Phytochemicals and their antifungal potential against pathogenic. **Intechopen**, 2019. Doi: 10. 5772/intechopen. 87302.

MOURI, A; DIAT, O; LEMER, D. A; EL-GHZAOU, A; AJOVALASIT, A; DORANDEU, C; MAUREL, J. C; DEVOISSELLE, J. M; LEGRAND, P. Water solubilization capacity of pharmaceutical microemulsions based on Peceol, lecithin and ethanol. **Int J Pharm**, v. 475, n. 1-2, p. 324-34, 2014.

NASCIMENTO, T. G; SILVA, P. F; AZEVEDO, L. F; ROCHA, L. G; PORTO, I. C. C. M; 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 nanoparticle of Brazilian Red Propolis extract: preparation, characterization, antioxidant and Leishmanial activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 30, p. 1- 16, 2016.

NASCIMENTO, T. S; SILVA, I. S. M; ALVES, M. C. M. A; GOUVEIA, B. B; BARBOSA, L. M. R; MACEDO, T. J. S; SANTOS, J. M. S; MONTE, A. P. O; MATOS, M. H. T; PADILHA, F. F; LIMA-VERDE, I. B. Effect of red propolis extract isolated or encapsulated in nanoparticles on the *in vitro* culture of sheep preantral follicle: impacts on antrum formation, mitochondrial activity and glutathione levels. **Reprod Domest Anim**, v. 54, n. 1, p. 31-38, 2019.

NUNES, S; MADUREIRA, A. R; CAMPOS, D; SARMENTO, B; GOMES, A. M; PINTADO, M; REIS, F. Solid lipid nanoparticles as oral delivery systems of phenolic compounds: overcoming pharmacokinetic limitations for nutraceutical applications. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 57, n. 9, p. 1863-1873, 2017.

ODRIOZOLA-SERRANO, I; OMS-OLIU, G; MARTÍN-BELLOSO, O. Nanoemulsion-based delivery systems to improve functionality of lipophilic components. **Front Nutr**, v. 1, p. 24, 2014.

OMENE, C; KALAC, M; WU, J; MARCHI, E; FRENKEL, K; O'CONNOR, D. A. Propolis and its active component, caffeic acid phenethyl ester (CAPE), modulate breast cancer therapeutic target via and epigenetically mediated mechanism of action. **J. Cancer. Sci Ther**, v. 5, n. 10, p. 334-342, 2014.

ONG, S. G. M; MING, L. C; LEE, K. S; YUEN, K. H. Influence of the encapsulation efficiency and size of liposome on the oral bioavailability of griseofulvin-loaded liposomes. **Pharmaceutics**, v. 8, n. 3, p. 25, 2016.

ONG, T. H; CHITRA, E; RAMAMURTH, S; SIDDALINGAM, R. P; YUEN, K. H; AMBU, S. P; DAVAMANI, F. Chitosan- propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, 2017.

PANDEY, M; CHOUDHURY, H; YEUN, O. C; YIN, H. M; LYNN, T. W; TINE, C. L. Y; WI, N. S; YEN, K. C. C; PHING, C. S; KESHARWANI, P; BHATTAMISRA, S. K; GORAIN, B. Perspective of nanoemulsion strategies in the improvement of oral, parenteral and transdermal chemotherapy. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 19, n. 4, p. 276-292, 2018.

PANDEY, R; AHMAD, Z; SHARMA, S; KHULLER, G. K. Nano-encapsulation of azole antifungals: potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 268-276, 2005.

PARVEEN, S; MISRA, R; SAHOO, S. K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine**, v. 8, n. 2, p. 147-66, 2012.

PATHAKOTI, K; MANUBOLU, M; HWANG, H. M. Nanostructures: current uses and future applications in food science. **J Food Drug Anal**, v. 25, n. 2, p. 245-253, 2017.

PATRA, J. K; DAS, G; FRACETO, L. F; CAMPOS, E. V. R; RODRIGUEZ-TORRES, M. P; ACOSTA-TORRES, L. S; DIAZ-TORRES, L. A; GRILLO, R; SWAMY, M. K; SHARMA, S; HABTEMARIAM, S; SHIN, H. S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **J Nanobiotechnology**, v. 16, n. 71, 2018.

PENICHE, H; PENICHE, C. Chitosan nanoparticles: a contribution to nanomedicine. **Polym Int**, v. 60, p. 883- 889, 2011.

PERAZZO, A; PREZIOSI, V; GUIDO, S. Phase inversion emulsification: current understanding and applications. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 222, p. 581-99, 2015. Doi: 10.1016/j.cis.2015.01.001

PERIASAMY, V. S; ATHINARAYANAN, J; ALSHATWI, A. A. Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of *Nigella sativa L.* essential oil on human breast cancer cells. **Ultrason Sonochem**, v. 31, p. 449-55, 2016.

PIPI, B; LANA, A. J; MORAES, R. C; GÜEZ, C. M; MACHADO, M; DE-OLIVEIRA, L. F; LINO-VON-POSER, G; FUENTEFRIA, A. M. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. **J Appl Microbiol**, v. 118, n. 4, p. 839-850, 2015.

PUGLIA, C; LAURO, M. R; TIRENDI, G. G; FASSARI, G. E; CARBONE, C; BONINA, F; PUGLISI, G. Modern drug delivery strategies applied to natural active compounds. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 14, n. 6, p. 755-768, 2017.

QAYOOM, A; ANEESHA, V. A; ANAGHA, S; DAR, J. A; KUMAR, P; KUMAR, D. Lecithin-based deferroxamine nanoparticles accelerated cutaneous wound healing in diabetic rats. **Eur J Pharmacol**, v. 858, p. 172478, 2019. Doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172478

QUATRIN, P. M; VERDI, C. M; DE-SOUZA, M. E; DE-GODOI, S. N; KLEIN, B; GUNDEL, A; WAGNER, R; DE-ALMEIDA-VAUCHER, R; OURIQUE, A. F; SANTOS, R. C. V. Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp. **Microb Pathog**, v. 112, p. 230-242, 2017.

RAI, V. K; MISHRA, N; YADAV, K. S; YADAV, N. P. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **J Control Release**, v. 270, p. 203-225, 2018.

RALIYA, R; SINGH-CHADHA, T; HADDAD, K; BISWAS, P. Perspective on nanoparticle technology for biomedical use. **Curr Pharm Des**, v. 22, n. 17, p. 2481-90, 2016.

RANI, A. P. Study on influence of polymer and surfactant on in vitro performance of biodegradable aqueous-core nanocapsules of tenofovir disoproxil fumarate by response surface methodology. **Braz J Pharm Sci**, v. 55, 2019. Doi: 10.1590/s2175-97902019000118736

RASSU, G; COSSU, M; LANGASCO, R; CARTA, A; CAVALLI, R; GIUNCHEDI, P; GAVINI, E. Propolis as lipid bioactive nano-carriers for topical nasal drug delivery. **Colloids and surfaces**, v. 136, p. 908-917, 2015.

REHMAN, F. U; SHAH, K. U; SHAH, S. U; KHAN, I. U; KHAN, G. M; KHAN, A. From nanoemulsions to self-nanoemulsions, with recent advances in self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS). **Expert Opin Drug Deliv**, v. 14, n. 11, p. 1325-1340, 2017.

RINALDI, F; HANIEH, P. N; LONGHI, C; CARRADORI, S; SECCI, D; ZENGIN, G; AMMENDOLIA, M. G; MATTIA, E; DEL-FAVERO, E; MARIANECCI, C; CARAFA, M. Neem oil nanoemulsions: characterization and antioxidant activity. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 32, n. 1, p. 1265-1273, 2017.

RODRIGUES, C. R. F; PLENTZ, L. C; MARCUCCI, M. C; DIHL, R. R; LEHMANN, M. *In vivo* evaluation of mutagenic and recombinogenic activities of Brazilian propolis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 96, p. 117-121, 2016.

ROSSETO, H. C; TOLEDO, L. A. S; FRANCISCO, L. M. B; ESPOSITO, E; LIM, Y; VALACCHI, G; CORTES, R; BRUSCHI, M. L. Nanostructured lipid systems modified with waste material of propolis for wound healing: design, in vitro and in vivo evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 441-452, 2017.

ROY, N; MONDAL, S; LASKAR, R. A; BASU, S; MANDAL, D; BEGUM, N. A. Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles by Indian propolis and its constituents. **Colloids and surfaces**, v. 76, p. 317-325, 2010.

SALES-CAMPOS, H; SOUZA, P. R; PEGHINI, B. C; DA-SILVA, J. S; CARDOSO, C. R. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. **Mini Rev Med Chem**, v. 13, n. 2, p. 201-210, 2013.

SANTOS, D. C; DAVID, J. M; DAVID, J. P. Composição química, atividade citotóxica e a antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. **Quim Nova**, v. 40, n. 2, p. 171-175, 2017.

SANTOS, L. M; FONSECA, M. S; SOKOLONSKI, A. R; DEEGAN, K. R; ARAÚJO, R. P. C; UMSZA-GUEZ, M. A; BARBOSA, J. D. V; PORTELA, R. D; MACHADO, B. A. S. Propolis: types, composition, biological activities and veterinary product patente prospecting. **J Sci Food Agric**, 2019.

SAPORITO, F; SANDRI, G; BONFERONI, M. C; ROSSI, S; BOSELLI, C; ICARO-CORNAGLIA, A; MANNUCCI, B; GRISOLI, P; VIGANI, B; FERRARI, F. Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing. **Int J Nanomedicine**, v. 13, p. 175-186, 2017.

SEIBERT, J.B; BAUTISTA-SILVA, J. P; AMPARO, T. R; PETIT, A; PERVIER, P; ALMEIDA, J. C. S; AZEVEDO, M. C; SILVEIRA, B. M; BRANDÃO, G. C; SOUZA, G. H. B; TEIXEIRA, L. F. M; SANTOS, O. D. H. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. **Food Chemistry**, v. 287, p. 61-67, 2019.

SENYIGIT, T; SONVICO, F; ROSSI, A; TEKMEK, I; SANTI, P; COLOMBO, P; NICOLI, S; ÖZER, Ö. *In vivo* assessment of Clobetasol propionate-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for skin delivery. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 1, 2016. Doi: 10.3390/ijms18010032

SHAH, J; NAIR, A. B; JACOB, S; PATEL, R. K; SHAH, H; SHEHATA, T. M; MORSY, M. A. Nanoemulsion based vehicle for effective ocular delivery of moxifloxacin using experimental design and pharmacokinetic study in rabbits. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 5, 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11050230.

SHANMUGAPRIYA, K; KIM, H; SARAVANA, P. S; CHUN, B. S; KANG, H. W. Astaxanthin- α -tocopherol nanoemulsion formulation by emulsification methods: investigation

on anticancer, wound healing, and antibacterial effects. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 172, p. 170-179, 2018.

SHARMA, N; MADAN, P; LIN, S. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: a co-surfactant study. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 404-416, 2016.

SHAVISI, N; KHANJARI, A; BASTI, A. A; MISAGHI, A; SHAHBAZI, Y. Effect of PLA films containing propolis ethanolic extract, cellulose nanoparticle and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on chemical, microbial and sensory properties of minced beef. **Meat Sci**, v. 124, p. 95-104, 2017. Doi: 10.1016/j.meatsci.2016.10.015

SHUBHARANI, R; MAHESH, M; MURTHY, V. N. Y. Biosynthesis and characterization, antioxidant and antimicrobial activities of selenium nanoparticles from ethanol extract of bee propolis. **J Nanomed Nanotech**, v. 10, n. 1, 2019. Doi: 10.4172/2157-7439.1000522.

SILVA, A. C; AMARAL, M. H; LOBO, J. M; LOPES, C. M. Lipid nanoparticles for the delivery of biopharmaceuticals. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 16, n. 4, p. 291-302, 2015.

SILVA, I. S. M; GASPAR, L. M. A. C; ROCHA, A. M. O; COSTA, L. P; TADA, D. B; FRANCESCHI, E; PADILHA, F. F. Encapsulation of red própolis in polymer nanoparticles for the destruction of pathogenic biofilms. **AAPS PharmSciTech**, v. 21, n. 2, p. 49, 2020.

SILVA, R. P. D; 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 proprierts of various Brazilian propolis extracts. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. 1-19, 2017.

SILVA-BRUNELLO, R. A; SOUZA, M. F; OLIVEIRA, D. A; BONA, E; LEIMANN, F. V; FILHO, L. C; ARAÚJO, P. H. H; FERREIRA, S. R. S; GONÇALVES, O. H. Preparation of curcumin-loaded nanoparticles and determination of the antioxidant potential of curcumin after encapsulation. **Polímeros**, v. 26, n. 3, 2016.

SILVA-CARVALHO, R; BALTAZAR, F; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: a complex natural product with a plethora of biological activities that can be explored for drug development. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2015. Doi: 10.1155/2015/206439

SINGH, Y, MEHER, J. G; RAVAL, K; KHAN, F. A; CHAURASIA, M; JAIN, N. K; CHOURASIA, M. K. Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery. **J Control Release**, v. 252, p. 28-49, 2017.

SMITH, M. C; CRIST, R. M; CLOGSTON, J. D; MCNEIL, S. E. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. **Anal Bioanal Chem**, v. 409, v. 24, p. 5779-5787, 2017.

SOLEIMANIAN, Y; GOLI, S. A. H; VARSHOSAZ, J; SAHAFI, S. M. Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers made from beeswax, propolis wax and pomegranate seed oil. **Food Chem**, v. 244, p. 83-92, 2018.

SOLIMAN, G. M. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: achievements and challenges. **Int J Pham**, v. 523, n. 1, p. 15-32, 2017.

SOSA, L; CLARES, B; ALVARADO, H. L; BOZAL, N; DOMENECH, O; CALPENA, A. C. Amphotericin B releasing topical nanoemulsion for the treatment of candidiasis and aspergillosis. **Nanomedicine**, v. 13, n. 7, p. 2303-2312, 2017.

SRIKAR, G. Study on influence of polymer and surfactant on in vitro performance of biodegradable aqueous-core nanocapsules of tenofovir disoproxil fumarate by response surface methodology. *Braz J Pharm Sci*, v. 55, 2019. Doi: 10.1590/s2175-97902019000118736

STETEFELD, J; MCKENNA, S. A; PATEL, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys Rev*, v. 8, n. 4, p. 409-427, 2016.

SUKHANOVA, A; BOZROVA, S; SOKOLOV, P; BERESTOVOY, M; KARAULOV, A; NABIEV. *Nanoscale Research Letters*, v. 13, n. 44, 2018.

SUN, L; LIAO, K; HANG, C. Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances the antifungal activity of fluconazole against resistant *Candida albicans*. *Phitomedicin*, v. 40, p. 55- 58, 2018.

SZWEDA, P; GUCWA, K; KURZYK, E; ROMANOWSKA, E; DZIERZANOWSKA-FANGRAT, K; ZIELINSKA, J. A; KUS, P. M; MILEWSKI, S. Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* clinical isolates. *Indian J Microbiol*, v. 55, n. 2, p. 175-183, 2015.

TADROS, T; IZQUIERDO, P; ESQUENA, J; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in colloid and interface science*, v. 108-109, p. 303-318, 2004. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>.

TAKAISI- KIKUNI, N. B; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigation of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined Propolis provenance. *Planta Med*, v. 60, p. 222-227, 1994.

TAN, S. L; STANSLAS, J; BASRI, M; ABEDI-KARJIBAN, R. A; KIRBY, B. P; SANI, D; BASRI, H. B. Nanoemulsion-based parenteral drug delivery system of carbamazepine: preparation, characterization, stability evaluation and blood-brain pharmacokinetics. *Curr Drug Deliv*, v. 12, n. 6, p. 795-804, 2015.

TAPIA-HERNÁNDEZ, J. A; RODRÍGUEZ-FELIX, F; JUÁREZ-ONOFRE, J; RUIZ-CRUZ, S; ROBLES-GARCÍA, M. A; BORBOA-FLORES, J; WONG-CORRAL, F. J; CINCOMOROYOQUI, F. J; CASTRO-ENRÍQUEZ, D. D; DEL-TORO-SÁNCHEZ, C. L. Zein-polysaccharide nanoparticles as matrices for antioxidant compounds: a strategy for prevention of chronic degenerative diseases. *Food Research International*, v. 111, p. 451-471, 2018.

THAKKAR, H. P; KHUNT, A; DHANDE, R. D; PATEL, A. A. Formulation and evaluation of itraconazole nanoemulsion for enhanced oral bioavailability. *J Microencapsul*, v. 32, n. 6, p. 559-69, 2015.

TOBALDINI-VALERIO, F. K; BONFIM-MENDONÇA, P. S; ROSSETO, H. C; BRUSCHI, M. L; HENRIQUES, M; NEGRI, M; SILVA, S; SVIDZINSKI, T. I. E. Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. *Future Microbiology*, v. 11, n. 8, p. 1035-1046, 2016.

TONE, Q. J; HAMMER, K. D. P; JOHNSON, E. M; ZEGARRA, M; GOTO, M; LO, T. S. A systematic review and meta-analysis on the use of prophylactic topical antibiotics for the prevention of uncomplicated wound infection. *Infect Drug Resistance*, v. 11, p. 417-425, 2018.

TORLAK, G; SERT, D. Antibacterial effectiveness of chitosan-propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. **International J Biol Macromol**, v. 60, p. 52-55, 2013.

VATER, C; ADAMOVIC, A; RUTTENSTEINER, L; STEINER, K; TAJPARA, P; KLANG, V; ELBE-BÜRGER, A; WIRTH, M; VALENTA, C. Cytotoxicity of lecithin-based nanoemulsions on human skin cells and *ex vivo* skin permeation: comparison to conventional surfactant types. **Int J Pharmaceutics**, v. 566, p. 383-390, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.078>.

VERMA, S; BHARDWAJ, A; VIJ, M; BAJPAI, P; GOUTAM, N; KUMAR, L. Oleic acid vesicles: a new approach for topical delivery of antifungal agent. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 42, n. 2, p. 95-101, 2014.

VIMBELA, G. V; NGO, S. M; FRAZE, C; YANG, L; STOUT, D. A. Antibacterial properties and toxicology from metallic nanomaterials. **Inter J Nanomed**, v. 12, p. 3941- 3965, 2017.

WAGH, V. D. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2013.

WALLER, S. B; PETER, C. M; HOFFMANN, J. F; PICOLI, T; OSÓRIO, L. G; CHAVES, F; ZANI, J. L; FARIA, R. O; MELLO, J. R.B; MEIRELES, M. C. A. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its in vitro activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 117-121, 2017.

WU, L; ZHANG, J; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.

YAKUGAKU, Z. Nanosize particle analysis by Dynamic Light Scattering (DLS). **Yakugaku Zasshi**, v. 139, n. 2, p. 237-248, 2019.

YAN, L; YANG, Y; ZHANG, W; CHEN, X. Advaned materials and nanotecnology for drug delivery. **Advanced materials**, v. 26, p. 553 –5540, 2014.

YANASARN, N; SLOAT, B. R; CUI, Z. Nanoparticles engineered from lecithin-in-water emulsions as a potential delivery system for docetaxel. **Int J Pharm**, v. 379, n. 1, p. 174-80, 2009.

YANG, K; HAN, Q; CHEN, B; ZHENG, Y; ZHANG, K; LI, Q; WANG, J. Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application. **Int J Nanomedicine**, v. 13, p. 2217-2263, 2018.

YUKUYAMA, M. N; GHISLENI, D. D; PINTO, T. J; BOU-CHACRA, N. A. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics-a review. **Int J Cosmet Sci**, v. 38, n. 1, p. 13-24, 2016.

YUKUYAMA, M. N; KATO, E. T; LOBENBERG, R; BOU-CHACRA, N. A. Challenges and future prospects of nanoemulsion as a drug delivery system. **Curr Pharm Des**, v. 23, n. 3, p. 495-508, 2017.

ZHANG, H; FU, Y; NIU, F; LI, Z; BA, C; JIN, B; CHENG, G; LI, X. Enhanced antioxidant activity and in vitro release of propolis by acid-induced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 104- 112, 2018.

ZHANG, H; FU, Y; NIU, Y; NIU, F; LI, Z; BA, C; JIN, B; CHEN, G; LI, X. One-step assembly of zein/caseinate/alginate nanoparticles for encapsulation and improved bioaccessibility of propolis. **Food & Function**, 2019.

ZHANG, L; WANG, S; ZHANG, M; SUN, J. Nanocarriers for oral drug delivery. **J Drug Target**, v. 21, n. 6, p. 515-27, 2013.

ZHANG, S; HAN, Y. Preparation, characterization and antioxidant activities of rutin-loaded zein-sodium caseinate nanoparticles. **PLOS ONE**, v. 13, p. 1-13, 2018.

ZHOU, M; GE, X; KE, D. M; TANG, H; ZHANG, J. Z; CALVARESI, M; GAO, B; SUN, L; SU, Q; WANG, H. The bioavailability, biodistribution, and toxic effects of silica-coated upconversion nanoparticles *in vivo*. **Front Chem**, v. 7, p. 218, 2019.

10. ANEXO 1

11. ANEXO 2



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL BIOLÓGICO (NANOESTRUTURADOS OU ISOLADOS), SOBRE CÉLULAS NORMAIS E MICROORGANISMOS

Pesquisador: Najeh Maissar Khalil

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08020818.3.0000.0106

Instituição Proponente: Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.231.864

Apresentação do Projeto:

Trata-se da apreciação do projeto de Iniciação Científica intitulado AVALIAÇÃO DO EFEITO DE COMPOSTOS COM POTENCIAL BIOLÓGICO (NANOESTRUTURADOS OU ISOLADOS), SOBRE CÉLULAS NORMAIS E MICROORGANISMOS, de interesse e responsabilidade do proponente Najeh Maissar Khalil.

A utilização de sistemas nanoestruturados, ou compostos isolados, no tratamento de doenças, baseia-se na sua habilidade de liberar doses concentradas de fármacos em locais específicos, pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentadas e, conseqüentemente, reduzindo a exposição aos tecidos saudáveis e diminuindo a possibilidade de efeitos tóxicos. Com isso, o presente projeto tem por objetivo avaliar o potencial citotóxico de diferentes compostos, acoplados em sistemas nanoestruturados ou isolados, sobre células normais e sobre microrganismos.

Serão coletados 5 mL de sangue total de vinte indivíduos voluntários adultos sadios, em tubo de ensaio contendo anticoagulante. Todas as práticas de coleta sanguínea serão seguidas de acordo com a RDC nº 34 de 11 de Junho de 2014. O sangue será centrifugado por tempo e velocidade de rotação pré-determinado, a 4 °C, e então será retirado o plasma e a camada de leucócitos por aspiração. Em seguida, a suspensão de hemácias será lavada com solução de tampão fosfato 50 mM, 0,15 mM de NaCl pH 7,4 por três vezes. As hemácias serão ressuspensas em solução a ser

Endereço: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, nº 838 - Campus CEDETEG - (ao lado dos laboratórios do curso de
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-167
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep@unicentro.br



Continuação do Parecer: 3.231.864

definida, que dependerá da análise a ser executada. Diversas concentrações de sistemas nanoestruturados e/ou dos compostos serão incubados com a solução de hemácias em tempos diferentes, à 37 °C, com constante homogeneização. Após, a solução será centrifugada a 1200 G, a 4 °C, por 5 minutos. O conteúdo de hemoglobina será determinado no sobrenadante através da medida da absorbância em 540 nm (SILVA et al. 2001). Vale ressaltar que a abordagem aos participantes, a coleta e a análise das amostras serão realizadas no Farmácia Escola da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO).

Serão incluídos no estudo, indivíduos maiores de 18 anos, saudáveis e que aceitem voluntariamente participar da coleta de sangue.

Objetivo da Pesquisa:

Primário: Desenvolver sistemas nanoestruturados como carreadores de fármacos e analisar compostos isolados, com a finalidade de reduzir a citotoxicidade sobre hemácias e leucócitos, e avaliar capacidade antimicrobiana sob microrganismos. Os sistemas nanoestruturados a serem testados poderão ser obtidos utilizando diferentes polímeros e sistemas inorgânicos e/ou orgânicos, e os compostos a serem encapsulados nas nanopartículas ou testados isoladamente poderão pertencer a diferentes tipos de classes/grupos, por exemplo: produtos naturais, compostos orgânicos e/ou inorgânicos, compostos obtidos por síntese ou semi-síntese, produtos comercialmente disponíveis para uso na clínica médica, entre outros.

Secundário:

Analisar os sistemas/compostos sobre células normais (hemácias e leucócitos); Analisar os sistemas/compostos sobre espécies de microrganismos, fungos e/ou bactérias.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o pesquisador:

Riscos:

O procedimento utilizado será a coleta de sangue, sendo que esta poderá trazer desconforto devido a injúria ocasionada pela agulha. Serão preconizados as normas de biossegurança, utilizando agulhas e seringas descartáveis e antisepsia com álcool 70%. No caso da formação de hematoma ou abscesso cutâneo, o pesquisador tomará todas as providências para minimizar os efeitos da picada, como compressa gelada. Se você precisar de algum tratamento, por se sentir prejudicado por causa da pesquisa, ou sofrer algum dano decorrente da pesquisa, o pesquisador se responsabiliza pela assistência integral,

Endereço: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, nº 838 - Campus CEDETEG - (ao lado dos laboratórios do curso de
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-167
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep@unicentro.br



Continuação do Parecer: 3.231.864

imediate e gratuita.

Benefícios:

Contribuir com uma nova proposta farmacêutica, que reduza os efeitos adversos e citotóxicos induzidos pelos fármacos utilizados no tratamento de doenças.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente pesquisa apresenta relevância científica com método adequado para atingir aos objetivos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1) Check List inteiramente preenchido;
- 2) Folha de rosto com campos preenchidos e com carimbo identificador e assinada por Emerson Carraro - chefe do departamento de farmácia da unicentro;
- 3) Carta de anuência/autorização: Carimbada e assinada por Emerson Carraro - diretor da farmácia escola da Unicentro;
- 4) TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido). Anexado, com linguagem adequada e dentro do modelo disponibilizado pelo comep;
- 5) Projeto de pesquisa completo anexado pelo pesquisador;
- 6) Instrumento para coleta dos dados (questionário/roteiro/questões norteadora): Não se aplica.
- 7) Cronograma do projeto com vigência da pesquisa de 01/2019 a 30/11/2023. Início da coleta de dados: 15/05/2019.
- 8)- Orçamento: Apresentado na plataforma;

Recomendações:

(1)- Ressalta-se que segundo a Resolução 466/2012, item XI – DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL, parágrafo f), é de responsabilidade do pesquisador "manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa."

(2)- O TCLE, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, deve ser emitido em duas vias de igual teor. Todas as vias devem ser assinadas pelo pesquisador responsável e pelo participante. Uma via deverá ser entregue ao participante e a outra fará parte dos documentos do projeto, a serem mantidos sob a guarda do pesquisador.

Endereço: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, nº 838 - Campus CEDETEG - (ao lado dos laboratórios do curso de
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-167
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep@unicentro.br



Continuação do Parecer: 3.231.864

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A presente pesquisa está em conformidade com a Resolução 466/2012. Este CEP considera que todos os esclarecimentos necessários foram devidamente prestados, estando este projeto de pesquisa apto a ser realizado, devendo-se observar as informações presentes no item "Recomendações".

Considerações Finais a critério do CEP:

Em atendimento à Resolução CNS/MS- 466/2012, deverá ser encaminhado ao CEP o relatório parcial assim que tenha transcorrido um ano da pesquisa e relatório final em até trinta dias após o término da pesquisa. Qualquer alteração no projeto deverá ser encaminhada para análise deste comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1263197.pdf	19/03/2019 16:26:20		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_atualizado.pdf	19/03/2019 16:25:50	Najeh Maissar Khalil	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta.pdf	14/02/2019 15:16:21	Najeh Maissar Khalil	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	14/02/2019 15:16:00	Najeh Maissar Khalil	Aceito
Outros	checklist.pdf	13/02/2019 15:06:52	Najeh Maissar Khalil	Aceito
Folha de Rosto	20181126145909846.pdf	26/11/2018 17:27:22	Najeh Maissar Khalil	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, nº 838 - Campus CEDETEG - (ao lado dos laboratórios do curso de
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-167
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep@unicentro.br



UNICENTRO - UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO CENTRO
OESTE & CAMPUS





Continuação do Parecer: 3.231.864

GUARAPUAVA, 29 de Março de 2019

Assinado por:
Maria Emilia Marcondes Barbosa
(Coordenador(a))

Endereço: Alameda Élio Antonio Dalla Vecchia, nº 838 - Campus CEDETEG - (ao lado dos laboratórios do curso de
Bairro: Vila Carli **CEP:** 85.040-167
UF: PR **Município:** GUARAPUAVA
Telefone: (42)3629-8177 **Fax:** (42)3629-8100 **E-mail:** comep@unicentro.br

	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE			
	NUMERO AP-SP3-005	TITULO MODELO DE DECLARAÇÃO EM PORTUGUES PARA ENVIO DE AMOSTRAS	REVISÃO 01	PÁGINA 1/1

DECLARAÇÃO

Remetente:

Instituto Adolfo Lutz
 Centro de Parasitologia e Micologia
 Núcleo de Micologia
 Av. Dr. Arnaldo – 351 – 8º andar – Cerqueira César
 CEP: 01246-902 – São Paulo/SP
 TEL: (011) 30682890
 FAX: 30682890

Destinatário:

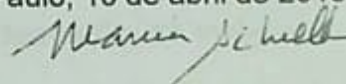
Profa. Dra. RUBIANA MAINARDES
 LABORATÓRIO DE NANOTECNOLOGIA
 UNICENTRO
 CAMPUS CEDETEG
 Rua Camargo Varela de Sá, 03
 Vila Carli
 CEP 85040-080
 GUARAPUAVA
 PARANÁ

FONE: (42) 3629 8160

Declaramos, para fins de embarque, que o material trata - se de 1 frasco contendo leveduras para documentação científica de trabalhos, contidas em 10 tubos, com aproximadamente 5 mL de meio sólido, cada um.

Declaramos, ainda, que o material não é perecível (manter em temperatura ambiente), não é tóxico, não é explosivo, não é inflamável, não tem valor comercial e destina-se única e exclusivamente para fins acadêmicos.

São Paulo, 10 de abril de 2018



Dra. Marcia de Souza Carvalho Melhem
 Pesquisadora Científica
 Núcleo de Micologia
 Instituto Adolfo Lutz





NUMERO	TÍTULO	REVISÃO	PÁGINA
P-NTORC-014	ACIDENTES NO TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO	00	1/2

ORIENTAÇÕES AOS MOTORISTAS

- Retirar as caixas padronizadas devidamente identificadas, fechadas e desinfetadas
- Colocar a(s) caixas(s) no porta malas do veículo e amarrá-las de forma que não se movimente(m)
- Entregar imediatamente ao destino, não devendo desviar a rota ou parar, por questões de segurança pessoal, da amostra e do exame.

EM SITUAÇÕES DE EMERGENCIA

SITUAÇÃO 01 – QUEDA DA CAIXA

- Não abrir a caixa
- Transportá-la até o laboratório e notificar a ocorrência da situação

SITUAÇÃO 02 – QUEDA DA CAIXA COM ABERTURA DA MESMA

- Colocar as luvas que estão no kit fornecido pelo laboratório
- Recolher o material para dentro da caixa, manuseando o mínimo possível, e fechá-la
- Retirar as luvas e descartá-la no saco de plástico branco contido no kit fornecido
- Transportar a caixa para o laboratório e notificar a ocorrência da situação

SITUAÇÃO 03 – QUEDA DA CAIXA COM ABERTURA E ESTRAVASAMENTO DE MATERIAL BIOLÓGICO

- Notificar a ocorrência da situação ao laboratório pelo fone (0XX19) 3524 .4525

SITUAÇÃO 04 – ACIDENTE DE TRANSITO OU QUEBRA DO VEÍCULO

- Notificar a ocorrência da situação a Concessionaria da Estrada, por ex. BANDEIRANTES – AUTOBAN, a fim de que o veículo seja substituído e as amostras sejam transportadas
- Notificar a ocorrência da situação ao laboratório pelo fone (0XX19) 3524 .4525

ORIENTAÇÕES AOS TÉCNICOS

1. Isolar a área e colocar o aviso:

“Proibida a entrada, material biológico derramado com formação de aerossol”

2. Não entrar no local por 30 minutos. Aguardar até que os aerossóis se dispersem e as partículas pesadas se sedimentem;
3. Colocar os EPIs adequados: máscara, luvas, avental, touca, sapato fechado;
4. Cobrir o local atingido com papel toalha;



NUMERO	TITULO	REVISÃO	PÁGINA
P-NTORC-014	ACIDENTES NO TRANSPORTE DE MATERIAL BIOLÓGICO	00	2/2

5. Colocar solução desinfetante adequado ao agente biológico (derramar em círculos de fora para dentro);
6. Deixar agir pelo menos por 30 minutos;
7. Colocar o papel toalha e o material biológico em saco branco;
8. Recolher o material quebrado com pá ou folhas de sulfite , servindo como apoio para proceder o recolhimento.
9. Colocar em caixa para perfurocortante, sinalizada com símbolo de infectante;
10. Fechar e lacrar a caixa, passando fita crepe ao redor; colocar em saco branco leitoso com símbolo de risco infectante;
11. Encaminhar para o coletor externo de resíduos biológicos;
12. Limpar a área contaminada com solução para descontaminação, colocar o material utilizado para descontaminação em saco branco leitoso com símbolo de risco infectante; encaminhar para o coletor externo de resíduo biológico.

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA

