

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CARREGADAS COM EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA COM APLICAÇÃO EM CREMES COSMECÊUTICO

Marianna Porfirio Brandão¹, Laís Farias de Azevedo², Priscilla da Fonseca Silva³, Fernanda Fernandes Alves⁴, Arthur Luy Tavares Ferreira Borges⁵, Ticiano Gomes do Nascimento⁶

1. Estudante de IC da Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL;
2. Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/ESENFAR/UFAL;
3. Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/ESENFAR/UFAL;
4. Estudante de IC da Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL;
5. Estudante de IC da Escola de Enfermagem e Farmácia da UFAL;
6. Professor do PPGCF/ESENFAR/UFAL / Orientador.

Resumo: A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas a partir de exsudatos de brotos e botões florais de diversas plantas. Possui coloração e consistência variadas e tem demonstrado várias atividades biológicas. Os nanoencapsulados poderão ser utilizados em formas farmacêuticas sólidas ou cosméticas devido ao uso de polímeros biodegradáveis, biocompatíveis e não tóxicos. O objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar nanopartículas carregadas com extrato de própolis vermelha. As nanopartículas poliméricas contendo extrato de própolis vermelha foram preparadas com uma combinação de Poli-ε-caprolactona e Eudragit, utilizando o método de nanoprecipitação. Foram caracterizadas por meio de técnicas físico-químicas. Apresentando em meio aquoso tamanho de partículas (100-200nm) em escala nanométrica. Após secagem usando método de liofilização, técnicas apropriadas revelaram encapsulamento dos flavonóides do extrato de própolis vermelha e atividade leishmanicida.

Palavras-chave: FTIR-ATR; Tamanho de partícula; Atividade Leishmanicida.

Apoio financeiro: UFAL, CNPq, CAPES, FAPEAL, FINEP.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UFAL

Introdução:

A própolis é uma substância resinosa não tóxica que tem sido empregada popularmente como agente terapêutico na medicina alternativa. No cenário brasileiro, a própolis vermelha das regiões litorâneas do estado de Alagoas tem-se destacado por apresentar coloração e composição química diferente de outros tipos de própolis encontradas no Brasil, como também, por apresentar atividades biológicas importantes, como: antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatória, antitumoral, antiulcerativa, cicatrizante e antioxidante (LUSTOSA et al., 2008)

Os compostos fenólicos, dentre eles os flavonóides, têm sido considerados como um dos principais constituintes biologicamente ativos da própolis, juntamente com os derivados do ácido cinâmico e seus ésteres e os diterpenos. A proporção dos compostos fenólicos é variável e também depende do local e da época da coleta. A amplitude das atividades biológicas da própolis é maior em áreas tropicais do planeta, refletindo a diversidade vegetal destas regiões. (CABRAL, 2009)

A pesquisa foi realizada em virtude do crescimento da utilização de fitoterápicos pela população brasileira. Dois fatores poderiam explicar este aumento. O primeiro seriam os avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes. O segundo é a crescente tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde. (BRUNING M. C. R., et al., 2012)

Extratos brutos de própolis vermelha foram utilizados para a preparação dos nanoencapsulados de própolis vermelha usando técnica apropriada. As técnicas realizadas mostraram resultados que de fato caracterizam a formação da nanopartícula e que o extrato bruto de própolis está incorporado à matriz de encapsulamento. Tendo como objetivo, a preparação e caracterização de nanoencapsulados contendo própolis vermelha. Com aplicabilidade nas áreas cosmeceúticas e tratamento de estética facial/corporal.

Metodologia:

1.Obtenção do extrato bioativo de própolis vermelha (EBPV)

As amostras de própolis vermelha foram coletadas no Apiário Ilha do Porto, localizado no município de Marechal Deodoro, litoral Sul do Estado de Alagoas. Quantidade de 100g da matéria prima bruta foi pesada, repicada em pedaços menores e submetida à extração com 1000 mL de etanol a 80% por 48 horas. O processo foi repetido até a obtenção do extrato bruto para então ser submetido à rotaevaporação.

2.Método de preparação das nanopartículas

Uma solução foi preparada com Poli-ε-caprolactona e Pluronic F108 em acetona, outra diluindo

Eudragit E100 nesse mesmo solvente, levadas a banho ultrassônico até dissolução dos polímeros. Em seguida preparou-se uma solução com EBPV. As soluções contendo os polímeros foram vertidas separadamente na solução de EBPV. A partir disso, a precipitação foi realizada pipetando-se 350 µL da formulação em tubos falcons. Posteriormente, acrescentou-se água Mili-Q, e os tubos foram centrifugados. O precipitado foi coletado e acondicionado em frascos protegidos da luz, congelados e liofilizados com o objetivo de se obter nanopartículas sólidas.

3. Caracterização das nanopartículas

- Tamanho de partícula, Índice de polidispersão e Potencial zeta

As determinações de diâmetro médio e do índice de polidispersão das nanopartículas em suspensão foram realizadas através de espalhamento de luz dinâmico. Analisadas no equipamento Zetasizer, Nano-ZS da Malvern. O potencial zeta das suspensões foi obtido através da técnica de mobilidade eletroforética no mesmo aparelho Zetasizer, Nano-ZS da Malvern.

- FTIR-ATR

As nanopartículas foram submetidas à análise de FTIR-ATR. Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier foram obtidos no modo de transmissão em um espectrômetro FTIR da Thermo Scientific/Software Ommic. Através da técnica de espectroscopia ATR (Refletância Total Atenuada), comprimento de onda de 4000 a 400 cm⁻¹ por transmitância em porcentagem.

- Atividade leishmanicida

As cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* (IOC-L0566 - MHOM/BR/1975/M2903) foram cedidas pela Prof^a Dr^a. Maria Edileuza Felino de Brito do departamento de imunologia do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FioCruz/PE (UFPE) na forma promastigotas que foram cultivadas in vitro em meio bifásico Schneider's/Novy-McNeal-Nicolle (NNN), suplementadas com 10% de soro fetal bovino inativado (BFS), 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina e incubadas em uma câmara de BOD na temperatura de 26°C por 24 horas. Antes de cada experimento observou-se em microscópio óptico de luz invertida a motilidade flagelar dos parasitos. O ensaio foi realizado com a Prof^a. Dr^a Louisianny Guerra da Rocha no departamento de parasitologia da UFRN. A atividade leishmanicida das formulações e do EBPV foi avaliada pela inibição do crescimento das formas promastigotas após 24h de incubação a 26°C, através da contagem do número total de promastigotas vivas, considerando a motilidade flagelar.

Resultados e Discussão:

1. Análises do tamanho médio de partícula, carga de superfície e índice de polidispersão das suspensões de Eudragit® E100 e PCL contendo o extrato de própolis vermelha.

As suspensões de nanopartículas de Eudragit® E100, PCL e extrato de própolis apresentaram diâmetro médio em torno de 100 – 200 nm (**Tabela 1**). Alguns fatores podem interferir nas dimensões das nanopartículas como: a utilização do ultrassom nas etapas iniciais do procedimento, a natureza e a concentração do polímero na fase orgânica, a polaridade dos solventes, a natureza e a concentração dos surfactantes na fase aquosa (SANTOS-MAGALHÃES, PONTES, et al., 2000; ZILI, SFAR e FESSI, 2005).

O potencial zeta indica a carga da superfície das partículas decorrente da dissociação dos grupos funcionais ou pela adsorção de substâncias iônicas encontradas no meio aquoso (SCHAFFAZICK, GUTERRES, et al., 2003). Valores acima do módulo de 30 mV indicam que as suspensões tendem a se manter estáveis evitando agregação das nanopartículas. Essa estabilidade ocorre devido à repulsão das cargas, afastando as partículas umas das outras.

Com relação ao índice de polidispersão (Pdl) observa-se na **Tabela 1** que todas as formulações apresentaram valores inferiores a 0,2, sendo caracterizadas como suspensões de boa homogeneidade e com baixo índice de polidispersão, sendo assim, consideradas como suspensões homogêneas e monodispersas. (CAZO, PEREIRA-FILHO, et al., 2012; SOUZA, LOBO, et al., 2012)

Tabela 1. Tamanho médio de partículas, potencial zeta e índice de polidispersão (PDI) das formulações LCEUP 20%, LCEUP 30%, LCEUP 40% e LCEUP placebo.

Formulações	Tamanho de Partículas (nm)	Potencial Zeta (mV)	Índice de Polidispersão (Pdl)
LCEUP 20%	200,8 ± 1,6	+25,0 ± 0,6	0,12
LCEUP 30%	191,0 ± 1,8	+29,6 ± 0,6	0,08
LCEUP 40%	195,8 ± 3,4	+18,0 ± 1,5	0,11
LCEUP Placebo	221,1 ± 1,2	+32,4 ± 0,8	0,10

Valores referentes à média de três leituras para tamanho médio de partículas e Pdl; Valores referentes à média da determinação de três valores do potencial zeta ± desvio padrão. Fonte: Autor, 2018.

A concentração do EBPV nas nanopartículas estudadas neste trabalho não influenciou no tamanho das nanopartículas, pois quando se faz a comparação do tamanho das partículas das formulações com os tamanhos de partícula do seu respectivo placebo, observa-se que o tamanho foi mantido dentro da mesma faixa que as do placebo. Esse comportamento já era esperado uma vez que em estudos anteriores foi observado que a natureza e concentração do princípio ativo não interferem no tamanho das nanopartículas quando são obtidas pelos métodos de nanoprecipitação ou emulsão-difusão (GUTERRES, FESSI, *et al.*, 1995; SANTOS, NASCIMENTO, *et al.*, 2006).

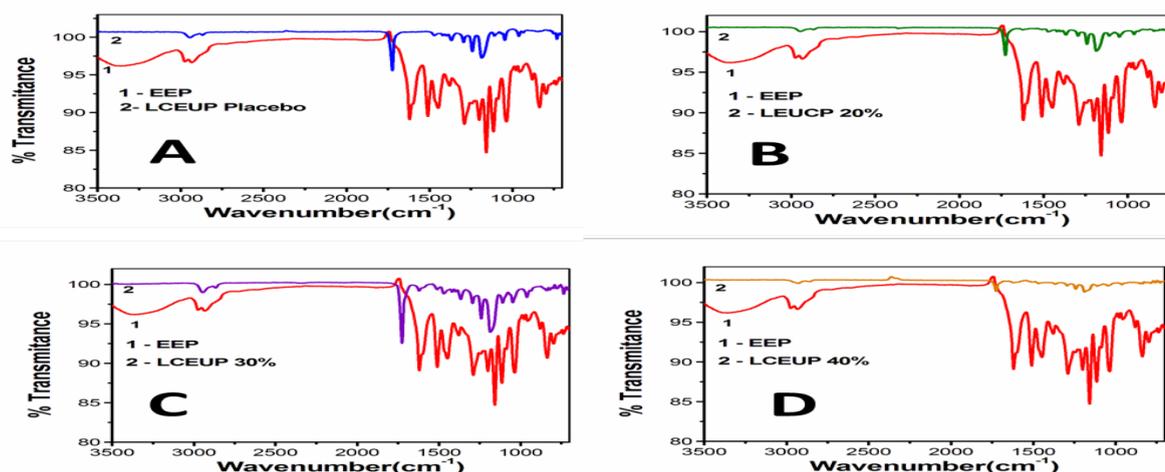
A utilização de um surfactante no processo de obtenção de nanopartículas é essencial para manter o diâmetro da partícula estável, pois o surfactante promove um sistema de repulsão das partículas evitando agregação destas.

2. Análises qualitativas dos espectros de FTIR

O extrato de própolis vermelha possui uma composição variada de substâncias. No entanto, destaca-se a presença de ácidos fenólicos, flavonóides e isoflavonóides. A técnica de espectroscopia FTIR – ATR foi utilizada para analisar a presença dos grupamentos químicos da matriz polimérica e do EBPV, como também para identificar a forma de interação entre estes componentes nas formulações.

Observa-se que no espectro (Figura 1) os estiramentos característicos da matriz polimérica Eudragit® E100 – PCL – Pluronic® F-68 quando comparados com os espectros das formulações NCEUP 20%, NCEUP 30% e NCEUP 40% ocorre o desaparecimento dos estiramentos característico do EBPV e os estiramentos característicos da matriz polimérica é bastante evidente. Diante do exposto, pode-se verificar que o extrato de própolis utilizado nas formulações possui a presença de compostos aromáticos característicos de fenóis, flavonóides e isoflavonóides. Comprovando que houve incorporação do mesmo à matriz polimérica das formulações.

Figura 1. Espectros FTIR-ATR. (A) EBPV, espectro 1 e LCEUP Placebo, espectro 2. (B) EBPV, espectro 1 e LCEUP 20%, espectro 2. C) EBPV, espectro 1 e LCEUP 30%, espectro 2. (D) EBPV, espectro 1 e LCEUP 40%, espectro 2.



Fonte: Autor, 2018.

3. Atividade Leishmanicida

O EBPV e as nanopartículas das formulações NCEU e NCPCL apresentaram atividade leishmanicida comprovadas com valores de IC₅₀ representados na Tabela 2. Estes resultados mostraram linearidade com a eficiência de encapsulação (%EE). A formulação NCPCL 30% apresentou resultados próximo ao do extrato na forma livre, o EBPV.

Tabela 2. Valores de IC₅₀ do EBPV e dos Nanoencapsulados (NCEU e NCPCL).

	Concentração inibitória (IC ₅₀)	Intervalo de confiança 95%
EBPV	38,30 µg/mL	33,57 – 43,11 µg/mL
NCEU 25%	268,3 µg/mL	260,20 – 276,50 µg/mL
NCEU 30%	179,9 µg/mL	172,40 – 187,50 µg/mL
NCPCL 30%	31,16 µg/mL	28,60 – 35,70 µg/mL
NCPCL 40%	47,23 µg/mL	42,41 – 52,23 µg/mL
NCPCL 50%	154,2 µg/mL	140,6 – 169,2 µg/mL

Fonte: Autor, 2018.

A Tabela 3 mostra a correlação entre a eficiência de encapsulação e os valores de IC₅₀, onde a formulação NCEU 25% que apresentou %EE mais baixa, mostrou valores mais elevados de concentração inibitória, em contrapartida a formulação NCPCL 30%, formulação que apresentou melhor %EE, mostrou menor concentração com capacidade de inibir o crescimento das formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*.

Tabela 3. Eficiência de encapsulação x IC₅₀.

	%EE	IC ₅₀
NCEU 25%	28,04%	268,3 µg/mL
NCEU 30%	55,34%	179,9 µg/mL
NCPCL 30%	76,72%	31,16 µg/mL
NCPCL 40%	66,74%	47,23 µg/mL
EBPV	–	38,3 µg/mL

Fonte: Autor, 2018.

Desta forma, pode-se estabelecer uma correlação direta entre os valores de IC₅₀ para *Leishmania braziliensis* e %EE das formulações.

Conclusões:

Portanto, o sistema matricial de copolímero PCL-Eudragit foi capaz de encapsular diferentes flavonóides de própolis vermelha com características particulares de solubilidade através da obtenção de nanopartículas. Dessa forma, as nanopartículas contendo extrato bioativo de própolis vermelha apresentam características promissoras para a indústria farmacêutica/cosmética na preparação de nanocosméticos como: cremes hidrofílicos(o/a), protetores solares, loções, pomadas e cremes com indicações antienvhecimento ou cicatrizantes, além de sua atividade leishmanicida.

Referências bibliográficas

BRUNING, M. C. R. et al. **A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde.** Ciênc. saúde coletiva vol.17 no.10 Rio de Janeiro Out. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232012001000017>. Acesso em: setembro de 2016.

CABRAL I. S. B., et al. **Composição Fenólica, Atividade Antibacteriana e Antioxidante da Própolis Vermelha Brasileira.** Revista Química Nova, Vol. 32, No. 6, 1523-1527, 2009.

CAZO, N. A. et al. **Nanopartículas de poli-ε-caprolactona carregadas com hidrocortisona: preparação usando planejamento fatorial e sua avaliação.** Orbital The Electronic Journal of Chemistry, v. 4, n. 2, p. 54-76, Abril-Junho 2012.

GUTERRES, S. S. et al. Poly (DL-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and stability study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1,2, p. 57-63, January 1995.

LUSTOSA, S.R. et al. **Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.18, p. 447-454, 2008.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S. et al. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 208, n. 1-2, p. 71-80, November 2000.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos.** Química Nova, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SOUZA, P. M. S. et al. **Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε- caprolactona contendo o herbicida atrazina.** Quim. Nova, v. 35, n. 1, p. 132- 137, 2012.

ZILI, Z.; SFAR, S.; FESSI, H. Preparation and characterization of poly-ε- caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, n. 1-2, p. 261-267, April 2005.