

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências - Campus de Bauru

Julia dos Santos Cabral

**Comparação da síntese e caracterização físico-química de carreadores
lipídicos nanoestruturados contendo Artepillin C e própolis verde**

Bauru
2025



Julia dos Santos Cabral

Comparação da síntese e caracterização físico-química de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo Artepillin C e própolis verde

Trabalho de conclusão de curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências, Bauru, para obtenção do título de Bacharel em Física de Materiais.

Orientador: Prof Dr. Wallace Moreira Pazin

Bauru
2025

Cabral, Julia dos Santos.

Comparação da síntese e caracterização físico-química de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo Artepillin C e própolis verde / Julia dos Santos Cabral. – Bauru, 2025

67 p. : il. tabs

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado – Física de Materiais)–Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru

Orientador: Wallance Moreira Pazin

1. Artepelin C; 2.própolis verde; 3.carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs); 4.encapsulação.

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 09 dias do mês de dezembro de 2025, às 10h00, em sessão pública em formato virtual via Google Meet, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Prof. Dr. Wallace Moreira Pazin e composta pelos examinadores Profa. Dra. Marina Piacenti da Silva e Dra. Gília Cristine Marques Ruiz, a aluna Julia dos Santos Cabral apresentou o trabalho de conclusão de curso intitulado: **“Comparação da síntese e caracterização físico-química de carreadores lipídicos nanoestruturados contendo Artepillin C e própolis verde”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do curso de Física – Bacharelado em Física de Materiais. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **aprovação** do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao aluno e demais presentes e eu, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais examinadores e pelo aluno.



Orientador



Membro 1



Membro 2



Aluno (a)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha família, que sempre foi meu alicerce. A todos os meus avós, tios, e primos, por todo o carinho, incentivo e união que sempre me acompanharam ao longo da vida. Um agradecimento especial aos meus pais e à minha irmã, por todo o amor incondicional, paciência e apoio em cada etapa desta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Wallance Moreira Pazin, agradeço pela orientação, confiança, dedicação e por todas as contribuições fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas da turma, aos amigos que estiveram sempre presentes, e aos companheiros de laboratório, que tornaram a rotina acadêmica mais leve e colaborativa. Agradeço também ao grupo GFAMN, pela troca de experiências, aprendizados e pela convivência enriquecedora.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), agradeço pela formação de excelência e pela infraestrutura oferecida, que tornaram possível a realização deste estudo.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido por meio do processo 2023/01305-1, que tornou possível a realização deste projeto.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, deixo aqui o meu sincero agradecimento.

RESUMO

A Artepelin C (ARTC), principal constituinte fenólico bioativo da própolis verde brasileira, apresenta fortes atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena; entretanto, seu potencial terapêutico é limitado pela baixa solubilidade em água e reduzida biodisponibilidade. Este estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) como sistemas de liberação para ARTC e extrato de própolis verde (PROP). Diferentes composições lipídicas e métodos de preparação foram avaliados por meio de testes de miscibilidade, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e eficiência de encapsulação (EE). Formulações à base de miristato de miristila, ácido cáprico/caprílico e Poloxamer 188 apresentaram desempenho físico-químico superior, especialmente quando preparadas pelo método de emulsificação-ultrassonicação. As NLCs otimizadas exibiram tamanhos médios de partícula inferiores a 120 nm, baixa polidispersidade ($PDI < 0,2$) e potenciais zeta entre -12 e -21 mV, mantendo-se estáveis por até 190 dias. A formulação com os lipídios miristato de miristila e ácido cáprico/caprílico utilizando o método de emulsão ultrassonicação (F4) atingiu uma eficiência de encapsulação de 100%, tanto para ARTC quanto para o extrato de própolis, conforme confirmado por HPLC. Análises complementares, incluindo FTIR, espectroscopia Raman e difração de raios X, revelaram a incorporação bem sucedida dos compostos bioativos sem comprometer a organização cristalina da matriz lipídica. A análise por rastreamento de nanopartículas (NTA) confirmou alta concentração de partículas e distribuição de tamanho uniforme, enquanto as imagens de Cryo-TEM mostraram nanopartículas esféricas e bem definidas, com morfologia preservada. Esses resultados demonstram que os NLCs desenvolvidos oferecem uma plataforma robusta e eficiente para a liberação de ARTC e própolis verde, apoiando seu potencial uso em formulações terapêuticas e cosméticas.

Palavras-chave: Artepelin C; própolis verde; carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs); encapsulação

ABSTRACT

Artepillin C (ARTC), the major bioactive phenolic constituent of Brazilian green propolis, exhibits strong antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities; however, its therapeutic potential is limited by poor aqueous solubility and low bioavailability. This study aimed to develop and characterize nanostructured lipid carriers (NLCs) as delivery systems for ARTC and green propolis extract. Different lipid compositions and preparation methods were screened through miscibility assessment, dynamic light scattering (DLS), and encapsulation efficiency (EE). Formulations based on myristyl myristate, capric/caprylic triglycerides, and Poloxamer 188 demonstrated superior physicochemical performance, particularly when prepared by the emulsification–ultrasonication method. The optimized NLCs presented mean particle sizes below 120 nm, low polydispersity ($PDI < 0.2$), and zeta potentials ranging from -12 to -21 mV, remaining stable for up to 190 days. Encapsulation efficiency reached 100% for both ARTC and propolis extract, as confirmed by HPLC. Complementary analyses including FTIR, Raman spectroscopy, and X-ray diffraction revealed successful incorporation of the bioactive compounds without disrupting the crystalline organization of the lipid matrix. Nanoparticle tracking analysis (NTA) confirmed high particle concentration and uniform size distribution, while Cryo-TEM imaging showed spherical, well-defined nanoparticles with preserved morphology. These findings demonstrate that the developed NLCs offer a robust and efficient platform for delivering ARTC and green propolis, supporting their potential application in therapeutic and cosmetic formulations.

Keywords: Artepillin C; green propolis; nanostructured lipid carriers (NLCs); encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação da estrutura molecular da Artepillin C. 22
- Figura 2.** Esquema ilustrativo da incorporação de compostos bioativos em sistemas de lipídicos, comparação entre o arranjo altamente ordenado dos solid lipid nanoparticles (SLN), e a matriz lipídica desordenada dos nanostructured lipid carriers (NLC), que aumenta a capacidade de encapsulação e reduz a expulsão do ativo. 25
- Figura 3.** Ilustração esquemática do método de preparo das nanopartículas lipídicas por injeção de solvente. (1) O Aquecimento simultâneo das fases lipídica e aquosa a 70 °C, (2) injeção lenta da fase orgânica (lipídica) na fase aquosa contendo surfactante, sob agitação magnética constante, (3) resultando na formação de nanopartículas lipídicas estáveis. 29
- Figura 4.** Ilustração esquemática do método de preparo das nanopartículas lipídicas por emulsão seguida de ultrassonicação. (1) As fases lipídica e aquosa são aquecidas a 70 °C e posteriormente (2) homogeneizadas por mistura mecânica (3 min), (3) seguida de ultrassonicação (15 min), originando uma emulsão fina e a subsequente formação das nanopartículas lipídicas. 30
- Figura 5.** Cromatogramas obtidos das formulações F3ARTC e F4ART após processo de filtração para separação do ARTC livre e encapsulado. Os dados foram utilizados para cálculo da %EE e análise comparativa. 38
- Figura 6.** Resultado visual do teste de miscibilidade dos lipídeos com o extrato de própolis verde. 1. AE/AO (2%); 2. AE/AO (4%); 3. AE/AO (6%); 4. MM/ACC (2%); 5. MM/ACC (4%); 6. MM/ACC (6%). 39
- Figura 7.** Análise visual das formulações NLCs controle (NLCC), com própolis (NLCP) e Artepillin C (NLCA) ao longo de 190 dias. 41
- Figura 8.** Curva de calibração do marcador químico Artepillin C (ARTC) obtida a 240 nm, relação linear entre a concentração (μM) e a absorbância (mAU), descrita pela equação da reta $y = 22818x - 83624$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9989$. 42

Figura 9. Espectros HPLC no tempo de retenção da ARTC (43,8 min). 42

Figura 10. Espectro HPLC das amostras NLCs sem ativo (NLCC) e com ativos NLCA 1,6 μM e NLCP 1,6 mg/mL., apresentando o pico de retenção da Artepillin C para as formulações encapsuladas. 43

Figura 11. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) dos Nanocarreadores Lipídicos Nanoestruturados (NLCs), mostrando a distribuição de tamanho e concentração de partículas, obtida em triplicata. Em concentração (partículas/mL) por tamanho das partículas (nm). (A)NLCC; (B) NLCA, 1,6 μM ; (C) NLCP, 1,6 mg/mL. 44

Figura 12. Imagens do vídeo em tempo real de 10 segundos de nanopartículas, obtidas por NTA, foram registradas no 1º e no 8º segundo. A) NLCC(1st); B) NLCC(8th); C) NLCA 1,6 μM (1st); D) NLCA 1,6 μM (8th); E) NLCP 1,6 mg/mL (1st) and F) NLCP 1,6 mg/mL (8th). 45

Figura 13. Espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos componentes da formulação (MM, P188, ACC) e das amostras de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (NLCC, NLCA e NLCP). Os espectros mostram as principais bandas de absorção correspondentes aos estiramentos e deformações características dos grupos funcionais presentes em cada amostra, em transmitância (%) por comprimento de onda (cm^{-1}). 47

Figura 14. Espectros de FTIR das amostras ARTC e PROP, evidenciando as principais bandas de absorção associadas aos grupos funcionais característicos. 49

Figura 15A. Espectros FTIR comparando amostras com ativos livre (PROP e ARTC), controle (NLCC) e ativos encapsulados (NLCA e NLCP). 50

Figura 13B. Espectros FTIR destacando as interações entre as amostras controle (NLCC) e encapsulados (NLCA e NLCP). 51

Figura 14. Espectros Raman dos carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs). (A) Espectros individuais do NLCC (azul), NLCP (vermelho) e NLCA (preto). (B) Espectros sobrepostos para comparação direta dos perfis vibracionais do NLCC (azul), NLCP (vermelho) e NLCA (preto). 52

Figura 15. Difractogramas de raios X (DRX) dos componentes sólidos e das formulações de NLCs. O componente lipídico MM é indicado em verde; o tensoativo Poloxamer 188 (POL) em rosa; a formulação NLCC em azul; a formulação NLCP em vermelho e a formulação NLCA em preto. 54

Figura 16. Micrografias Cryo-TEM das formulações de NLCs. (A) NLC C, (B) NLC A, (C) NLC P. 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Combinações de lipídios sólidos e líquidos utilizados nos testes de miscibilidade com o extrato de própolis verde (PROP), nas concentrações de 2%, 4% e 6% (m/m) 26
- Tabela 2.** Comparação das formulações F1 a F4 pelos valores de índice de polidispersividade (PDI), tamanho hidrodinâmico (nm) e potencial zeta (ZP, mV) 34
- Tabela 3.** Resultado visual do teste de miscibilidade dos lipídeos com o extrato de própolis verde 36
- Tabela 4.** Resultados da caracterização DLS e estabilidade ao longo de 190 dias das formulações de NLCs em termos de tamanho, PDI, ZP e %EE. 38
- Tabela 5.** Caracterização DLS das formulações de NLC em termos de tamanho (nm) e concentração (partícula/mL) das formulações controle (NLCC) e com ativos (NLCA 1,6 µM) e (NLCP 1,6 mg/mL) 41
- Tabela 6.** Análise das principais bandas de absorção no espectro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) das amostras MM, ACC, P188 e NLCC, indicando os comprimentos de onda (cm^{-1}) e as respectivas atribuições vibracionais dos grupos funcionais característicos 45
- Tabela 7.** Posições dos picos de difração (2θ) dos componentes e das formulações de NLCs obtidas por DRX 51
- Tabela 8.** Posições dos picos, ângulos θ correspondentes e espaçamentos interplanares d dos componentes puros e das formulações de NLCs, determinados por difração de raios X ($\lambda = 0,154 \text{ nm}$) 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARTC	Artepillin C
PROP	Extrato Etanólico de Própolis Verde
AE	Ácido Esteárico
AO	Ácido Oleico
T80	Tween 80
ACC	Ácido Cáprico/Caprílico
P188	Poloxamer 188
ATF	Ácido Trifluoroacético
NLC	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (Nanostructured Lipid Carriers)
NLC _C	Carreador Lipídico Nanoestruturado Controle (formulação sem incorporação de ativos)
NLC _A	Carreador Lipídico Nanoestruturado com Artepillin C encapsulado
NLC _P	Carreador Lipídico Nanoestruturado com extrato etanólico de própolis verde encapsulado
F1	Formulação composta por ácido esteárico, ácido oleico e Tween 80, preparadas por injeção de solvente
F2	Formulação composta por ácido esteárico, ácido oleico e Tween 80, preparadas pelo método de emulsificação-ultrassonicação
F3	Formulação composta por miristato de miristila, ácido caprílico/cáprico e Poloxamer 188, por injeção de solvente
F4	Formulação composta por miristato de miristila, ácido caprílico/cáprico e Poloxamer 188, preparada por emulsão-ultrassonicação
DLS	Dispersão Dinâmica de Luz (Dynamic Light Scattering)

PDI	Índice de Polidispersividade (Polydispersity Index)
ZP	Potencial Zeta (Zeta Potential)
NTA	Concentração do Número de Nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EE	Eficiência de Encapsulação
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
DRX	Difração de Raios X
Cryo-TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica

LISTA DE SÍMBOLOS

SPAN	Parâmetro de largura da distribuição de tamanhos de partículas
D10	Diâmetro abaixo do qual se encontram 10% das partículas da distribuição
D50	Diâmetro mediano da distribuição; valor abaixo do qual se encontram 50% das partículas
D90	Diâmetro abaixo do qual se encontram 90% das partículas da distribuição
ζ	Potencial Zeta
λ	Comprimento de onda
θ	Ângulo de Bragg
d	Espaçamento interplanar
β'	Forma polimórfica β -prime

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
2.3 Organização da monografia	18
3 REVISÃO TEÓRICA	20
3.1 Própolis	20
3.1.1 Própolis Verde Brasileira	20
3.1.1.1 Artepillin C	22
3.2 Sistemas Nanoestruturados	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Materiais	28
4.2 Métodos	28
4.2.1 Comparação componentes formulação e métodos	28
4.2.2 Miscibilidade dos compostos ativos com os lipídeos	29
4.2.3 Síntese das NLCs e métodos	30
4.2.3.1 Injeção de Solvente	30
4.2.3.2 Emulsificação-ultrasonicação	30
4.3 Caracterização das NLCs	32
4.3.1 Determinação de tamanho de partículas, PDI, ZP e estabilidade coloidal	32
4.3.2 Concentração do número de nanopartículas (NTA)	32
4.3.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	33
4.3.4 Difração de Raios X (DRX)	33
4.4 Quantificação de ARTC e Eficiência de encapsulação em NLC	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1 Resultados dos estudos preliminares para seleção da melhor formulação	37
5.1.1 Comparação físico-químicos e %EE das Formulações F1-F4	37
5.1.2 Miscibilidade dos compostos ativos com os lipídeos	39
5.2 Resultados da formulação selecionada	40
5.2.1 Eficiência de encapsulamento e estabilidade coloidal das NLCs	41
5.2.2 Determinação do Tamanho e Quantificação de NLCs por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	44
5.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	46
5.2.3.1 Interação dos componentes da formulação	47
5.2.3.2 Interação dos compostos bioativos com as NLCs	49
5.2.4 Espectroscopia Raman	52
5.2.5 Difração de Raio X (DRX)	53
5.2.6 CRYO-TEM	56
6 CONCLUSÃO	58

1 INTRODUÇÃO

A própolis, um produto resinoso amplamente utilizado na medicina popular, tem despertado ao longo das últimas décadas grande interesse científico devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas (SALATINO, 2018; ZHANG, C. PING et al., 2017). A própolis verde brasileira, produzida por *Apis mellifera* a partir de compostos presentes em *Baccharis dracunculifolia*, é particularmente valorizada por sua rica composição de compostos fenólicos. Entre eles, a Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) é reconhecida como seu principal constituinte bioativo e está intimamente associada à qualidade e à eficácia biológica da própolis verde (ZHANG, C. PING et al., 2017; VEIGA, R. S. et al., 2017).

A Artepillin C apresenta fortes atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena, que têm sido atribuídas às suas características estruturais, incluindo anéis aromáticos, ligações duplas e um grupo hidroxila fenólico (VEIGA, R. S. et al., 2017; SZLISZKA, E. et al., 2013). Devido à sua natureza lipofílica, a Artepillin C interage fortemente com membranas biológicas, e estudos demonstram que essas interações dependem do pH e da força iônica, com efeitos mais pronunciados em pH baixo, quando a forma não ionizada se torna mais hidrofóbica e exibe maior afinidade por membranas (CAMURI, I. J. et al., 2019; PAZIN, W. M. et al., 2021). Apesar de seu perfil farmacológico promissor, a limitada solubilidade em água e as restrições físico-químicas da Artepillin C reduzem sua biodisponibilidade e eficiência terapêutica in vivo (PAZIN, W. M. et al., 2017).

Nanomateriais têm emergido como carreadores promissores para a liberação de compostos bioativos devido à sua capacidade de melhorar a solubilidade, a estabilidade e o desempenho terapêutico em sistemas biológicos (KUMARI, P. et al., 2020). Na oncologia, essas nanoestruturas são particularmente atraentes porque permitem liberação sustentada, circulação prolongada e maior seletividade para células tumorais (YINGCHONCHAROEN, P. et al., 2016). Entre os nanocarreadores lipídicos, os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) representam a segunda geração de nanopartículas lipídicas sólidas e oferecem vantagens em relação aos nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs), incluindo maior capacidade de encapsulação e melhor estabilidade física decorrente da presença de uma fração lipídica líquida que gera uma matriz cristalina menos ordenada (KIM, D.-D. et al., 2014; NEVES CRUZ, J. et al., 2020).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados oferecem uma estratégia eficaz para superar essas limitações, melhorando a solubilidade, protegendo o composto da degradação e facilitando sua interação com ambientes biológicos. Considerando a relevância biomédica

tanto da própolis verde quanto de seu principal constituinte, a Artepillin C, o desenvolvimento de nanoformulações lipídicas otimizadas é essencial para expandir sua aplicabilidade farmacológica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar sistemas de carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) contendo Artepillin C (ARTC) e extrato de própolis verde brasileira (PROP), visando superar suas limitações de solubilidade e bioacessibilidade e garantir a obtenção de formulações estáveis e eficientes.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar e otimizar diferentes composições lipídicas para a formação de NLCs contendo Artepillin C e extrato de própolis verde, com base na miscibilidade entre os componentes.
- Avaliar as características físico-químicas das formulações obtidas, incluindo tamanho médio de partícula, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta, por meio de espalhamento dinâmico de luz (DLS), de forma a determinar a formulação mais eficiente.
- Determinar a eficiência de encapsulação (EE) dos compostos bioativos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).
- Caracterizar estruturalmente os NLCs por meio de análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman e difração de raios X (DRX), verificando a incorporação dos compostos sem alteração da matriz lipídica.
- Investigar a morfologia e a distribuição de tamanho das nanopartículas por rastreamento de nanopartículas (NTA) e microscopia eletrônica de transmissão criogênica (Cryo-TEM).
- Avaliar a estabilidade físico-química das formulações otimizadas ao longo do tempo.

2.3 Organização da monografia

- No Capítulo 1 deste trabalho é apresentada a introdução, abordando o contexto geral, a importância da própolis verde e do Artepillin C, bem como a justificativa para o uso de sistemas nanoestruturados lipídicos.
- No Capítulo 2 são descritos os objetivos gerais e específicos do estudo.
- No Capítulo 3 é apresentada a revisão teórica, com base nos principais conceitos relacionados à própolis verde, ao Artepillin C e aos sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs).

- No Capítulo 4 são descritos os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento experimental, incluindo os processos de formulação, caracterização e avaliação das formulações.
- No Capítulo 5 são apresentados e discutidos os resultados obtidos nas análises físico-químicas e estruturais das NLCs.
- No Capítulo 6 são apresentadas as conclusões obtidas a partir dos resultados deste trabalho.

3 REVISÃO TEÓRICA

3.1 Própolis

A própolis é um produto natural complexo, de origem predominantemente vegetal, amplamente reconhecido por sua composição química diversificada e pelo papel biológico que desempenha nas colônias de abelhas (Bankova V. et al., 2000; Sforcin J.M. & Bankova V., 2011). Trata-se de uma mistura resinosa formada a partir de substâncias coletadas pelas abelhas em diferentes partes de plantas, como brotos, cascas, exsudações e tecidos lesionados, e posteriormente modificadas por secreções enzimáticas das glândulas salivares das operárias (Marcucci M.C., 1995; Bankova V. et al., 2000). Esse material é utilizado para vedar frestas, reduzir a entrada de microrganismos e manter condições assépticas no interior da colmeia, garantindo a proteção da colônia e a estabilidade estrutural do ninho (Sforcin J.M. & Bankova V., 2011; Burdock G.A., 1998).

A composição química da própolis é altamente variável e depende de fatores como a espécie de abelha, a origem botânica das resinas coletadas, as condições geográficas e sazonais do ambiente e o método de extração empregado (Bankova V., 2005; Marcucci M.C., 1995; Salatino A. et al., 2011). De modo geral, é constituída por resinas e bálsamos (50 - 60%), ceras (cerca de 30%), óleos essenciais (até 10%) e pequenas quantidades de pólen e material orgânico volátil (Greenaway W. et al., 1990; Burdock G.A., 1998). Dentro dessa matriz complexa, já foram identificados centenas de compostos químicos, incluindo ácidos fenólicos e seus ésteres, flavonoides, terpenos, esteroides, aldeídos aromáticos e hidrocarbonetos alifáticos (Kujumgiev A. et al., 1999; Bankova V., 2005; Castro S.L. et al., 2014).

Entre os compostos mais relevantes, destacam-se os flavonoides (como pinocembrina, galangina e quercetina) e os derivados do ácido cafeico, em especial o éster fenílico do ácido cafeico (CAPE) e o Artepillin C (3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), predominantes na própolis verde brasileira. Esses compostos apresentam grupos fenólicos livres, responsáveis por sua reatividade química e por propriedades relacionadas a processos de oxidação e estabilização molecular.

3.1.1 Própolis Verde Brasileira

A própolis verde brasileira é uma das variedades mais estudadas e caracterizadas quimicamente entre as produzidas no mundo (PARK et al., 2002; KUJUMGIEV et al., 1999). É obtida principalmente pela *Apis mellifera* a partir das resinas da planta *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae), popularmente conhecida como “alecrim-do-campo”,

predominante nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (PARK et al., 2000; SALATINO et al., 2011). Sua composição química particular está diretamente associada à origem botânica dessa espécie vegetal, que fornece compostos fenólicos e terpenóides característicos, responsáveis por suas propriedades físico-químicas singulares (MARCUCCI et al., 2001; BANKOVA et al., 2005).

A própolis verde é marcada pela presença de ácidos cinâmicos prenilados e derivados fenólicos lipofílicos, sendo o Artepillin C o principal marcador químico dessa variedade (KUJUMGIEV et al., 1999; PARK et al., 2002). Outros compostos frequentemente identificados incluem baccarina, drupanina, cumarinas, ácido cafeico e seus derivados (como o CAPE), além de flavonoides como pinobanksina, kaempferol, isorhamnetina, naringenina e quercetina (SALATINO et al., 2011; MARCUCCI, 1995). As proporções variam conforme a região, a sazonalidade e a flora disponível para coleta (BANKOVA et al., 2005).

As propriedades físico-químicas da própolis verde são fortemente influenciadas pela natureza lipofílica de seus compostos majoritários. O Artepillin C, por exemplo, apresenta baixa solubilidade em meio aquoso e alta afinidade por solventes orgânicos, o que confere comportamento hidrofóbico acentuado (PARK et al., 2000). Essa característica afeta diretamente os processos de extração e incorporação de seus compostos ativos em matrizes biotecnológicas ou farmacêuticas, exigindo o uso de solventes adequados ou sistemas carreadores, como nanopartículas lipídicas (FROZZA et al., 2013).

A fração resinosa da própolis verde, responsável por cerca de 50 a 60% da massa seca, contém compostos fenólicos e terpenóides. A fração cerosa (aproximadamente 30%) é composta por álcoois e ácidos graxos de cadeia longa, além de hidrocarbonetos alifáticos e ésteres, que conferem plasticidade e aderência (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998). A fração volátil (menos de 10%) contém óleos essenciais e sesquiterpenos, responsáveis pelo aroma característico e por contribuir para a estabilidade química do material (GREENAWAY et al., 1990).

Do ponto de vista estrutural, os compostos fenólicos da própolis verde, especialmente os ácidos cinâmicos prenilados (Figura 1), exibem cadeias laterais insaturadas que favorecem interações hidrofóbicas e contribuem para a afinidade por membranas biológicas (PARK et al., 2002). Essa característica é particularmente relevante em estudos de incorporação em sistemas nanoestruturados, permitindo maior associação entre compostos bioativos e fases lipídicas (FROZZA et al., 2013).

A caracterização química e estrutural da própolis verde é amplamente realizada por técnicas espectroscópicas e cromatográficas. A cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC) é utilizada para identificação e quantificação dos marcadores fenólicos, enquanto a espectroscopia no infravermelho (FTIR) e a espectroscopia Raman permitem a identificação de grupos funcionais e a análise de interações com matrizes lipídicas (PARK et al., 2000). Técnicas de difração de raios X (DRX) também são aplicadas para avaliar o grau de cristalinidade da própolis e de seus constituintes, especialmente quando incorporados em sistemas de liberação controlada (FROZZA et al., 2013).

A prenilação dos ácidos fenólicos é um fator determinante para a lipofilicidade e estabilidade oxidativa dos compostos da própolis verde. Esse processo biossintético, comum em metabólitos secundários de *Baccharis dracunculifolia*, aumenta a afinidade por fases lipídicas e reduz a degradação em meios aquosos (PARK et al., 2000). A variabilidade sazonal e geográfica da própolis verde influencia não apenas sua composição, mas também propriedades físico-químicas como ponto de fusão, teor de cera, cor, viscosidade e índice de refração (SALATINO et al., 2011).

Sob a perspectiva química e tecnológica, a própolis verde brasileira pode ser entendida como um sistema fitoquímico heterogêneo e dinâmico, cuja composição e comportamento derivam da interação entre fatores biológicos (espécie vegetal e abelha coletora) e ambientais (clima e geografia) (BANKOVA et al., 2005). Sua matriz rica em compostos fenólicos lipofílicos, especialmente o Artepillin C, confere propriedades únicas que justificam seu emprego em estudos de encapsulação e em sistemas nanoestruturados lipídicos (FROZZA et al., 2013).

3.1.1.1 Artepillin C

O Artepillin C (3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) é o principal composto fenólico característico da própolis verde brasileira, sendo amplamente reconhecido como seu marcador químico (PARK et al., 2002; BANKOVA et al., 2005). Esse ácido cinâmico prenilado é um metabólito secundário derivado da planta *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), principal fonte botânica utilizada pela *Apis mellifera* na produção dessa variedade de própolis (PARK et al., 2000; SALATINO et al., 2011). Sua presença confere ao produto propriedades químicas e bioativas distintas em relação a outros tipos de própolis (MARCUCCI, 1995; PAZIN et al., 2017).

Do ponto de vista estrutural (Figura 1), o Artepillin C é um derivado do ácido *p*-cumárico, contendo duas cadeias preniladas (C₅H₈) ligadas ao anel aromático (MARCUCCI et al., 2001). Essa modificação confere ao composto uma elevada lipofilicidade e reduz sua solubilidade em solventes polares, o que influencia tanto sua

biodisponibilidade quanto sua manipulação em formulações farmacêuticas (FROZZA et al., 2013). O grupo hidroxila fenólico na posição para é responsável pela capacidade de doação de elétrons e pela atividade antioxidante, enquanto a cadeia lateral insaturada do ácido cinâmico contribui para reações de estabilização de radicais e interações com membranas biológicas (KUJUMGIEV et al., 1999; PAZIN et al., 2017).

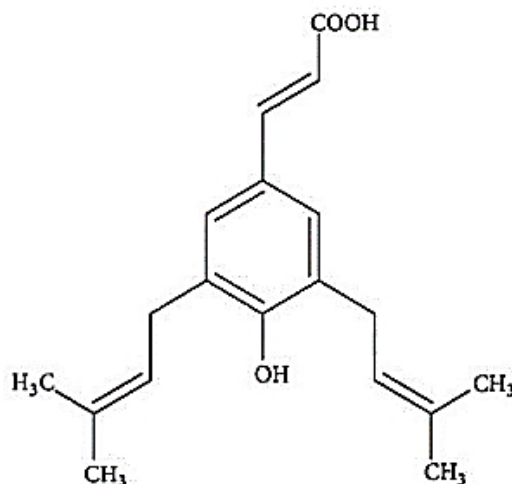


Figura 1. Representação da estrutura molecular da Artepillin C.

Em termos de propriedades físico-químicas, o Artepillin C apresenta massa molar de 300,39 g·mol⁻¹, ponto de fusão em torno de 157–159 °C e comportamento termicamente estável sob condições moderadas (BANKOVA et al., 2005). Sua baixa solubilidade em água e alta afinidade por solventes orgânicos, como etanol e metanol, refletem seu caráter predominantemente hidrofóbico (PARK et al., 2002). Essa característica, embora benéfica para atravessar barreiras lipídicas biológicas, representa um desafio para aplicações em sistemas aquosos, tornando necessário o desenvolvimento de estratégias de dispersão e encapsulação, como nanopartículas lipídicas sólidas (NLCs) e emulsões nanoestruturadas (FROZZA et al., 2013; PAZIN et al., 2017).

A biossíntese do Artepillin C ocorre por meio da via dos fenilpropanóides, na qual o ácido cinâmico é gerado a partir da desaminação da fenilalanina e subsequentemente sofre prenilação catalisada por preniltransferases específicas da *Baccharis dracunculifolia* (PARK et al., 2000). Esse processo confere ao composto sua estrutura característica, associada à alta reatividade com lipídios e à estabilidade oxidativa aumentada (MARCUCCI et al., 2001).

Diversos estudos apontam que o Artepillin C apresenta elevada estabilidade química frente à oxidação, devido à presença de substituintes prenilados que dificultam o ataque de radicais livres à estrutura aromática (PARK et al., 2002; PAZIN et al., 2017). Além disso, sua lipofilicidade favorece o acúmulo em fases apolares e a interação com membranas celulares,

o que explica parte de suas atividades biológicas observadas, como ação antioxidante, moduladora de enzimas oxidativas e estabilidade em sistemas biológicos (FROZZA et al., 2013).

Em formulações tecnológicas, o Artepillin C é considerado um desafio de solubilização, sendo comum o uso de solventes orgânicos, surfactantes ou veículos lipídicos para aumentar sua biodisponibilidade (PAZIN et al., 2017). A incorporação desse composto em sistemas nanoestruturados lipídicos (NLCs) permite melhorar a dispersão em meio aquoso, proteger o composto da degradação oxidativa e favorecer a liberação controlada. O caráter anfifílico desses sistemas favorece a inserção do Artepillin C na matriz lipídica, mantendo sua estabilidade físico-química e bioatividade (PAZIN et al., 2017).

Do ponto de vista analítico, o Artepillin C é identificado e quantificado principalmente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por UV-vis ou espectrometria de massas (LC-MS). Os espectros típicos apresentam bandas características associadas ao anel aromático conjugado e à cadeia prenilada, permitindo sua diferenciação de outros compostos fenólicos presentes na própolis (BANKOVA et al., 2005).

Assim, o Artepillin C pode ser compreendido como um composto fenólico prenilado de alta relevância química e tecnológica, cuja estrutura única combina propriedades lipofílicas, antioxidantes e estáveis, tornando-o um candidato ideal para estudos de incorporação em sistemas lipídicos nanoestruturados. Seu comportamento físico-químico, aliado à baixa solubilidade aquosa, fundamenta a necessidade de abordagens tecnológicas específicas para sua manipulação e aplicação em formulações biotecnológicas.

3.2 Sistemas Nanoestruturados

A nanotecnologia aplicada à área farmacêutica e biotecnológica tem se consolidado como uma ferramenta estratégica para o desenvolvimento de sistemas de liberação e transporte de moléculas bioativas (TORCHILIN, 2005; MÜLLER; MEHNERT, 2000). Em escala nanométrica (1-1000 nm), os materiais apresentam propriedades físico-químicas únicas, como alta área superficial, comportamento coloidal e capacidade de interagir de forma diferenciada com membranas biológicas, que os tornam particularmente adequados para aplicações terapêuticas, cosméticas e alimentares (SOUTO; MÜLLER, 2010).

Os sistemas nanoestruturados englobam uma ampla variedade de plataformas, incluindo lipossomas, micelas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas (TORCHILIN, 2005; MÜLLER et al., 2011). Esses sistemas têm como principais finalidades aumentar a solubilidade, a estabilidade, a biodisponibilidade e a eficácia de

compostos bioativos, especialmente daqueles com baixa solubilidade em água ou alta suscetibilidade à degradação química ou enzimática (SOUTO; MÜLLER, 2010; PAZIN et al., 2017).

A natureza e a organização estrutural das nanopartículas influenciam diretamente suas propriedades de encapsulação, liberação e interação com o meio biológico (MÜLLER; MEHNERT, 2000). Em geral, a redução do tamanho das partículas promove maior contato superficial entre o ativo e o meio, possibilitando liberação controlada e direcionada, além de melhorar a penetração tecidual e celular (TORCHILIN, 2005; MÜLLER et al., 2011).

Entre os tipos de nanopartículas, os sistemas lipídicos nanoestruturados têm recebido destaque por sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e capacidade de incorporar compostos lipofílicos (SOUTO; MÜLLER, 2010). Esses sistemas utilizam lipídios fisiologicamente compatíveis e surfactantes para formar matrizes sólidas, semissólidas ou híbridas, capazes de proteger o composto ativo contra degradação e volatilização (MÜLLER; MEHNERT, 2000). A versatilidade desses sistemas permite sua aplicação em diferentes áreas, como farmacologia, cosméticos, alimentos funcionais e produtos naturais, sendo uma alternativa promissora para o aproveitamento de compostos bioativos de difícil solubilização, como o Artepillin C (PAZIN et al., 2017).

3.2.1 Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (NLCs)

Os Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (NLCs, do inglês *Nanostructured Lipid Carriers*) representam a segunda geração de sistemas lipídicos nanoestruturados, desenvolvidos para superar as limitações apresentadas pelas Nanopartículas Lipídicas Sólidas (SLNs, do inglês *Solid Lipid Nanoparticles*) (MÜLLER; RUNGE; MEHNERT, 2002; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). Como apresentado na Figura 2, enquanto as SLNs são constituídas exclusivamente por lipídios sólidos, os NLCs incorporam uma mistura de lipídios sólidos e líquidos (óleos), formando uma matriz menos ordenada e mais flexível (SOUTO; MÜLLER, 2010). Essa característica estrutural aumenta o espaço para incorporação de compostos bioativos e reduz a expulsão do ativo durante o processo de cristalização e armazenamento (WISSING; MÜLLER, 2002; MÜLLER et al., 2011).

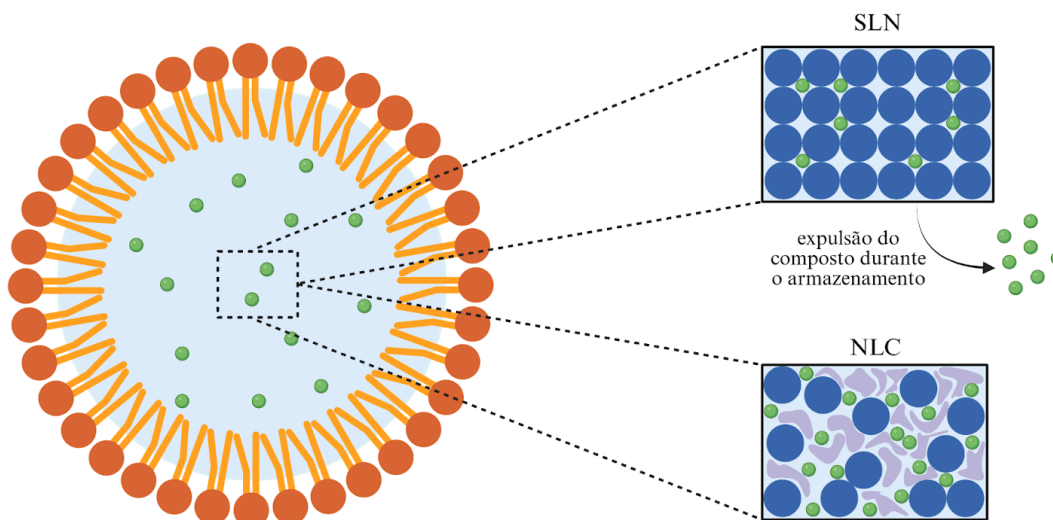


Figura 2. Esquema ilustrativo da incorporação de compostos bioativos em sistemas de lipídicos, comparação entre o arranjo altamente ordenado dos *solid lipid nanoparticles* (SLN), e a matriz lipídica desordenada dos *nanstructured lipid carriers* (NLC), que aumenta a capacidade de encapsulação e reduz a expulsão do ativo.

Do ponto de vista estrutural, os NLCs são compostos por três elementos principais: (i) uma fase lipídica contendo lipídios sólidos e líquidos em proporções controladas; (ii) uma fase aquosa contendo tensoativos que estabilizam a dispersão coloidal; e (iii) o composto ativo, que pode ser incorporado na matriz lipídica, adsorvido na superfície ou solubilizado na interface lipídio/água (MÜLLER; RUNGE; MEHNERT, 2002; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009). O resultado é um sistema estável, com tamanho médio de partícula geralmente inferior a 200 nm, baixo índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta adequado para garantir estabilidade físico-química (SOUTO; MÜLLER, 2010).

A combinação de lipídios sólidos (como miristato de miristila ou ácido esteárico) com lipídios líquidos (como triglicerídeos de cadeia média) promove imperfeições na estrutura cristalina, permitindo maior capacidade de encapsulação e reduzindo a migração do ativo (MÜLLER; MEHNERT, 2000). Essa característica torna os NLCs especialmente adequados para o carregamento de moléculas lipofílicas, como o Artepillin C e os compostos fenólicos presentes no extrato de própolis verde (PAZIN et al., 2017).

A preparação dos NLCs pode ser realizada por diferentes métodos, entre eles a emulsificação seguida de ultrassonicação e a injeção de solvente, que permitem o controle do tamanho e da morfologia das nanopartículas (WISSING; MÜLLER, 2002; SOUTO; MÜLLER, 2010). Após a formação, os sistemas podem ser caracterizados por técnicas como espalhamento dinâmico de luz (DLS), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectroscopia vibracional (FTIR, Raman),

para avaliação de suas propriedades físico-químicas e grau de incorporação dos ativos (MÜLLER et al., 2011; PARDEIKE; HOMMOSS; MÜLLER, 2009).

Devido à sua versatilidade e compatibilidade biológica, os NLCs têm sido amplamente explorados como veículos para antioxidantes, compostos fenólicos e agentes anticancerígenos (SOUTO; MÜLLER, 2010; PAZIN et al., 2017). No contexto deste trabalho, os NLCs foram desenvolvidos como um sistema carreador para o Artepillin C e para o extrato de própolis verde, buscando otimizar a dispersão, estabilidade e incorporação desses compostos bioativos em uma matriz lipídica estável e funcional (PAZIN et al., 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Ácido esteárico (AE, Sigma-Aldrich), ácido oleico (AO, Sigma-Aldrich), Tween 80 (T80, Sigma-Aldrich), miristato de miristila (MM, Croda), ácido cáprico/caprílico (CCT, Engenharia das Essências), Poloxamer 188 (P188, Sigma-Aldrich), extrato etanólico de própolis verde (PROP), acetonitrila (Sigma-Aldrich) e ácido trifluoroacético (ATF, Sigma-Aldrich). Unidade de filtração com poros de 10 kDa (Amicon, Merck Millipore). A Artepillin C (ARTC) foi adquirida da Wako, Japão. A fase aquosa utilizada neste estudo foi preparada com água Milli-Q (18,2 MΩ·cm).

4.2 Métodos

Para a definição da formulação final, foi inicialmente conduzido um estudo preliminar, esse estudo comparou os componentes da formulação, com diferentes tipos de lipídios e surfactantes, e os métodos de preparo injeção de solvente (SCHUBERT M.A. et al.) e emulsificação-ultrassonicação (DE MOURA L.D. 2021), com o objetivo de identificar a formulação mais promissora para continuidade do projeto.

4.2.1 Comparação componentes formulação e métodos

Inicialmente, foram avaliadas quatro formulações experimentais com variações tanto nos lipídios quanto no método de preparo:

- F1: ácido esteárico, ácido oleico e Tween 80, preparadas por injeção de solvente;
- F2: mesma composição lipídica da F1, preparadas pelo método de emulsificação-ultrassonicação;
- F3: miristato de miristila, ácido caprílico/cáprico e P188, por injeção de solvente;
- F4: mesma composição da F3, preparada por emulsão-ultrassonicação.

Todas as formulações foram avaliadas quanto ao tamanho de partículas (nm), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ZP) e concentração do número de nanopartículas (NTA), com o intuito de identificar o sistema com melhor tamanho e mais homogêneo.

Além disso, como F3 e F4 (compostas por MM, ACC e P188), apresentaram os melhores parâmetros, para comparação entre os métodos, foram sintetizadas novas formulações contendo o composto bioativo (ARTC, na concentração de 1,6 μM), resultando nas formulações F3_{ARTC} (Injeção solvente) e F4_{ARTC} (Emulsão-ultrassonicação) para avaliação

da diferença do método frente a eficiência de encapsulação (%EE) dos ativos por HPLC. E os resultados obtidos subsidiaram a escolha da formulação com melhor desempenho para os testes subsequentes, onde foram realizadas formulações controle (NLC_C) formulações com Artepillin C (NLC_A) e formulações com extrato etanólico de própolis verde (NLC_P)

4.2.2 Miscibilidade dos compostos ativos com os lipídeos

Com o objetivo de selecionar a composição lipídica mais compatível com o extrato de própolis verde, foi realizada uma avaliação preliminar de miscibilidade entre diferentes lipídios sólidos e líquidos. Os testes foram conduzidos utilizando apenas o extrato de própolis, uma vez que seu principal composto bioativo é o Artepillin C, responsável pela maior parte de suas propriedades físico-químicas e biológicas. Assim, o uso direto do extrato foi considerado uma alternativa economicamente viável, visto que o Artepillin C isolado apresenta custo elevado. Seis combinações de lipídios foram testadas, com variação na concentração do composto ativo (PROP) de 2%, 4% e 6%, conforme especificado na Tabela 1.

As combinações 1 a 3 foram constituídas por AE (lipídio sólido) e AO (lipídio líquido), enquanto as combinações 4 a 6 utilizaram MM (lipídio sólido) e ACC (lipídio líquido). O PROP foi adicionado diretamente à fase lipídica sob aquecimento a 70 °C e submetido à agitação constante a 312 rpm por 12 horas, em agitador magnético, a fim de favorecer a interação entre os componentes. A miscibilidade foi avaliada qualitativamente por inspeção visual, com base na homogeneidade da mistura e na ausência de separação de fases, precipitação ou turvação.

Tabela 1. Combinações de lipídios sólidos e líquidos utilizados nos testes de miscibilidade com o extrato de própolis verde (PROP), nas concentrações de 2%, 4% e 6% (m/m)

Combinações	AE (g)	AO (g)	PROP (g)	ACC (g)	MM (g)
1 (2%)	1,56	0,40	0,04	–	–
2 (4%)	1,52	0,40	0,08	–	–
3 (6%)	1,48	0,40	0,12	–	–
4 (2%)	–	–	0,04	0,40	1,56
5 (4%)	–	–	0,08	0,40	1,52
6 (6%)	–	–	0,12	0,40	1,48

4.2.3 Síntese das NLCs e métodos

4.2.3.1 Injeção de Solvente

Para as formulações preparadas pelo método de injeção de solvente (SCHUBERT M.A. et al.), com adaptações da técnica descrita. A fase aquosa foi composta por 16,6 mL de água milli-Q e tween 80 (5% m/m), previamente aquecida a 70 °C e agitada em agitador magnético. Simultaneamente, a fase orgânica foi preparada contendo ácido esteárico (77% m/m) e ácido oleico (23% m/m), dissolvidos em etanol sob aquecimento (70 °C) e agitação. A fase orgânica foi então injetada lentamente na fase aquosa sob agitação contínua, promovendo a formação das nanopartículas (Fig. 3).

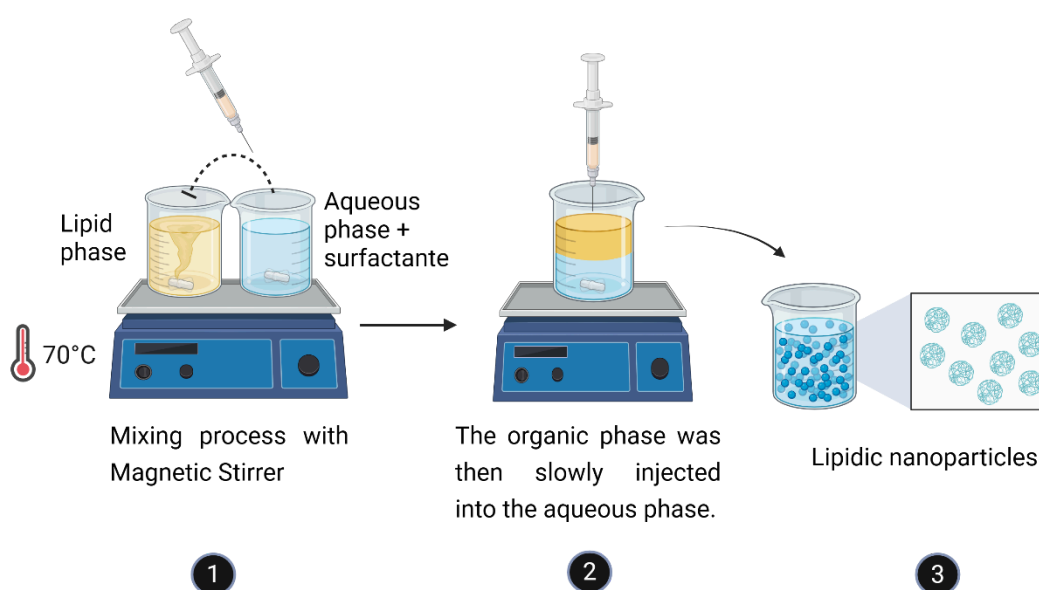


Figura 3. Ilustração esquemática do método de preparo das nanopartículas lipídicas por injeção de solvente. (1) O aquecimento simultâneo das fases lipídica e aquosa a 70 °C, (2) injeção lenta da fase orgânica (lipídica) na fase aquosa contendo surfactante, sob agitação magnética constante, (3) resultando na formação de nanopartículas lipídicas estáveis.

4.2.3.2 Emulsificação-ultrassônica

As formulações de NLC foram preparadas através do método de emulsificação-ultrassônica (DE MOURA L.D. 2021). Uma fase oleosa composta pelo lipídio sólido Miristato de Miristila (70% m/m), lipídio líquido ácido cáprico/caprílico (30% m/m) e os ativos variáveis (ARTC ou PROP) em diferentes concentrações, foi aquecida a 70 °C. A fase aquosa, contendo 10 mL de água milli-Q (v/v) e surfactante Poloxamer 188 (5% m/m) foi aquecida até à mesma temperatura, e ambas as fases foram misturadas sob agitação de alta velocidade (11.000 rpm) por 3 minutos em um homogeneizador Ultra-Turrax (IKA Werke, Staufen, Alemanha). A mistura foi então sonicada por 20 minutos em um sonicador de

ponta (ponta fina) Vibracell (Sonics & Mat. Inc., Danbury, CT, EUA) a 60 W e 20 kHz, em ciclos alternados de 30 segundos (ligado/desligado), para evitar o superaquecimento da amostra (Fig. 4). Após o processamento, as amostras foram armazenadas à temperatura ambiente (25 °C). Formulações controle (NLC_C), sem ARTC e sem PROP, também foram preparadas.

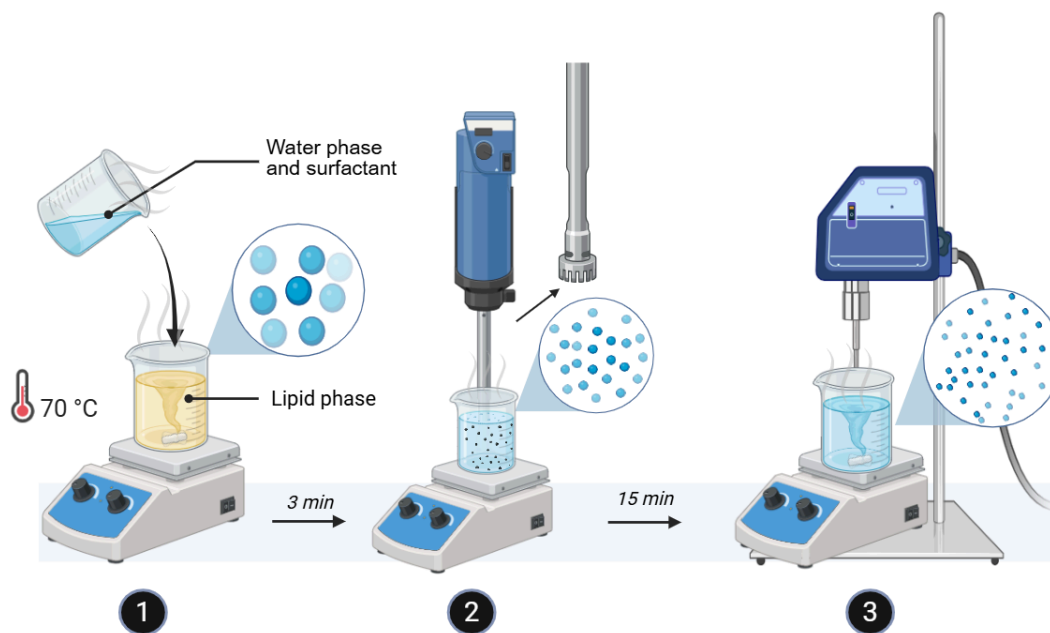


Figura 4. Ilustração esquemática do método de preparo das nanopartículas lipídicas por emulsão seguida de ultrassonicação. (1) As fases lipídica e aquosa são aquecidas a 70 °C e posteriormente (2) homogeneizadas por mistura mecânica (3 min), (3) seguida de ultrassonicação (15 min), originando uma emulsão fina e a subsequente formação das nanopartículas lipídicas.

A síntese das NLCs seguiu o princípio da emulsificação de lipídios fundidos em fase aquosa contendo surfactante, seguida por ultrassonicação e resfriamento, processo amplamente descrito na literatura. Na formulação, o derretimento e mistura dos lipídios sólidos e líquidos ocorre a uma temperatura 5 a 10 °C acima do ponto de fusão do lipídio sólido, formando-se uma fase lipídica homogênea (pré-emulsificação), etapa essencial para criar uma matriz desordenada que favorece a encapsulação do fármaco e a estabilidade física do sistema (FILTRIANI E.W. et al., 2024; CHAUHAN I. et al., 2020). Em seguida, a ultrassonicação é aplicada à mistura lipídica aquecida em presença de surfactante e fase aquosa, promovendo cavitação e cisalhamento intensos que resultam em uma nanoemulsão de tamanho reduzido e distribuições uniformes (baixo PDI) (AKADEMIA BARU P. et al., 2015). Na última etapa, o sistema é resfriado até a temperatura ambiente para solidificação

das NLCs, dando estabilidade e completando sua formação (KHAN S., 2023; AJIBOYE A.L., 2021).

Inicialmente, foi realizada uma pré-formulação (piloto) com concentrações reduzidas dos ativos (PROP e ARTC).

- NLC_C – controle (sem compostos encapsulados);
- NLC_{P 1,6 mg/mL} – PROP encapsulado na concentração de 1,6 mg/mL;
- NLC_{A 1,6 µM} – ARTC encapsulada na concentração de 1,6 µM.

Essas formulações foram derivadas da formulação F4, previamente selecionada com base nos melhores resultados obtidos entre todas as formulações testadas (F1 a F4 e F3_{ARTC} e F4_{ARTC}). A escolha foi fundamentada tanto nos parâmetros coloidais favoráveis (PDI, tamanho e ZP), quanto na %EE. Com isso, a formulação F4 (emulsão-método ultrassonicação) foi utilizada como base para os testes piloto, que incluíram avaliações de estabilidade e demais caracterizações físico-químicas.

4.3 Caracterização das NLCs

4.3.1 Determinação de tamanho de partículas, PDI, ZP e estabilidade coloidal

O tamanho das partículas (diâmetro hidrodinâmico) e o PDI foram determinados por dispersão dinâmica de luz (DLS). O ZP (ζ) foi obtido por meio da mobilidade eletroforética, utilizando um analisador Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido).

Além das análises instrumentais, foi realizada avaliação visual periódica, observando alterações macroscópicas como formação de sedimentos, aglomeração, mudança de coloração, formação de gel, turbidez excessiva ou presença de fungos, indicativas de instabilidade coloidal. A estabilidade físico-química e visual das formulações foi avaliada ao longo de 190 dias (formulações pilotos), com armazenamento a 25 °C.

4.3.2 Concentração do número de nanopartículas (NTA)

Para a determinação da concentração de nanopartículas, foi utilizada a análise de Nanotracking, em um equipamento NS300 (NanoSight, Amesbury, Reino Unido) equipado com um laser verde, a 532 nm. As amostras foram diluídas em 5000 vezes em água milli-Q e medidas em triplicata, a 25 °C. Cerca de 0,3 mL de amostras foram injetadas na câmara de amostra e visualizadas em tempo real. As imagens das nanopartículas foram capturadas em forma de filme de 10 segundos, e as partículas rastreadas foram calculadas e representadas em gráficos. Os resultados obtidos estavam no gráfico de tamanho ajustado por comprimento de trajeto finito (FTLA) por concentração. A forma de filme de 10 segundos das

nanopartículas foi apresentada na forma de captura de imagem em 1º segundo e 8º segundo para mostrar a visualização em tempo real realizada pela NTA.

Como parte da metodologia, também foi calculado o parâmetro SPAN, que quantifica a largura da distribuição de tamanhos das partículas e serve como indicador da uniformidade da formulação. O SPAN foi determinado pela Equação 1:

$$\text{SPAN} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (1)$$

em que D_{10} , D_{50} e D_{90} correspondem aos diâmetros abaixo dos quais se encontram 10%, 50% e 90% das partículas, respectivamente. Valores menores de SPAN indicam distribuições mais estreitas e homogêneas, complementando a análise de PDI na avaliação da estabilidade e da qualidade coloidal das NLCs.

4.3.3 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Medições de FTIR-ATR foram realizadas para caracterizar os grupos funcionais e avaliar possíveis interações químicas e reorganização lipídica nos NLCs na presença dos compostos. Para cada medição, as amostras foram depositadas sobre o cristal ATR de um espectrômetro PerkinElmer Spectrum 100. Os espectros foram registrados com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando a média de 16 varreduras no intervalo de 4000 a 500 cm^{-1} .

4.3.4 Difração de Raios X (DRX)

A estrutura cristalina das NLCs (após processo de liofilização) e dos compostos sólidos da formulação (MM e P188) foi analisada por difração de raios X (XRD) (Rigaku D/MAX-2100/PC) com radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), na faixa de 2θ de 5° - 45° e passo de $0,02^\circ$. As condições operacionais foram ajustadas para 40 kV e 30 mA . A técnica de XRD foi empregada para avaliar a cristalinidade e a composição de fases das amostras.

4.4 Quantificação de ARTC e Eficiência de encapsulação em NLC

As quantidades de Artepillin C (ARTC) encapsulado, tanto na forma isolada quanto presente no extrato de própolis, foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna C18 ($5 \mu\text{m}$), utilizando uma fase móvel composta por $0,1\%$ (v/v) de TFA em água e acetonitrila, aplicada sob gradiente linear de 5% a 100% de acetonitrila ou metanol ao longo de 60 min . O sistema operou com fluxo de 1 mL/min ,

volume de injeção de 20 µL e detecção realizada nos comprimentos de onda de 240 e 313 nm.

O método foi previamente validado, apresentando limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) de 3,0 µg/mL e 9,0 µg/mL, respectivamente, o que assegura que as concentrações obtidas na análise, expressas em unidades molares, se encontram dentro da faixa de resposta confiável do equipamento. Dessa forma, os resultados de quantificação correspondem a valores detectáveis e quantificáveis de maneira precisa e reprodutível, garantindo a robustez do método empregado.

Para a quantificação do ARTC encapsulado, 0,2 mL de cada formulação de NLC foi diluída com acetonitrila ou metanol até o volume final de 1,8 mL (n = 3), assegurando a ruptura das nanopartículas e a completa liberação do composto. Após centrifugação, o sobrenadante foi analisado nas condições cromatográficas descritas acima.

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada por ultrafiltração-centrifugação (10 kDa; Merck Millipore). Aliquotas de 0,4 mL foram centrifugadas a 13.900 rpm por 10 min, e o filtrado, correspondente à fração não encapsulada, foi quantificado por HPLC. O valor de EE% foi calculado a partir da razão entre a quantidade total de ARTC e a quantidade de ARTC livre, de acordo com a equação:

$$EE(\%) = \frac{(\text{quantidade total composto}) - (\text{quantidade livre composto})}{\text{quantidade total composto}} \times 100 \quad (2)$$

onde o total do fármaco é a quantidade de ARTC quantificada na suspensão de NLC e o fármaco livre representa a fração de ARTC não encapsulada, determinada no filtrado.

Este sistema permite controlar o pH da fase móvel e modular a retenção dos compostos ionizáveis (METZGER B., 2022). Este tipo de gradiente é eficaz para separar compostos de polaridades distintas, acelerando a eluição dos mais hidrofóbicos em tempo adequado e melhorando a detectabilidade das substâncias de interesse, como compostos fenólicos e flavonóides presentes na própolis (SAWAYA A. C. H. F. et al., 2011). O fluxo ideal e o gradiente bem controlados permitem, portanto, que os compostos mais polares eluam nos primeiros minutos, enquanto os mais hidrofóbicos são separados ao longo da corrida, resultando em um perfil cromatográfico ordenado e eficiente.

O HPLC é uma técnica analítica amplamente usada para separar, identificar e quantificar componentes de misturas dissolvidas, com base nas diferenças de afinidade dos

compostos entre a fase móvel (solventes) e a fase estacionária (coluna, onde ocorre a separação dos compostos) ([AHMED R., 2024](#)).

Além disso, o sistema pode operar em dois modos distintos. No modo isocrático, a composição da fase móvel permanece constante ao longo da corrida, o que é adequado para amostras simples. No modo gradiente, a proporção de solvente muda ao longo do tempo, geralmente aumentando a fração de solvente orgânico, o que acelera a eluição de compostos retidos e melhora a resolução em misturas complexas com ampla gama de polaridades. ([BASAK S. et al., 2025](#); [ZISI C. et al., 2018](#)). Como por exemplo, o PROP que possui tanto compostos polares quanto apolares.

A modalidade mais empregada é a cromatografia em fase reversa (RP-HPLC), a separação dos analitos ocorre pela diferença de afinidade entre uma fase. A fase estacionária é apolar (geralmente coluna C18) enquanto a fase móvel é polar (como água com solventes como metanol ou acetonitrila). Compostos polares eluem primeiro, enquanto os mais apolares têm maior retenção na coluna e eluem mais tardiamente ([AHMED R., 2024](#); [BASAK S. et al., 2025](#))

O equipamento de HPLC é composto por bombas de alta pressão (variando de 0,1 a 5,0 mL/min), injetores manuais ou automáticos, colunas com diversas fases estacionárias e detectores como UV-vis ou DAD, gerando um cromatograma onde cada pico corresponde a um composto eluído. A área de cada pico, comparada com padrões, permite quantificação dos analitos. A técnica é amplamente usada na indústria farmacêutica, ambiental e alimentícia, entre outras ([BIRD I. M. et al., 1989](#)).

Além disso, quando estudamos o HPLC e a PROP, é importante destacar os compostos polares e apolares. Uma molécula é considerada polar quando existe uma distribuição desigual de cargas elétricas (um dipolo permanente) devido à diferença de eletronegatividade entre seus átomos ([ISRAELACHVILI J. N. et al., 2011](#)). Já uma molécula apolar tem distribuição uniforme de elétrons, ou possui geometria molecular simétrica que cancela possíveis dipolos internos ([TYKODI R.J., 1989](#)).

No PROP, encontram-se tanto compostos polares (ácidos fenólicos e flavonóides hidroxilados), quanto apolares (terpenos e ARTC). A própolis é rica em compostos polares polifenólicos, entre eles os ácidos fenólicos (como o ácido cafeico e o ácido ferúlico) e os flavonoides hidroxilados (como quercetina, kaempferol e galangina). Esses grupos são caracterizados pela presença de múltiplos radicais hidroxila (OH) e carboxila (COOH), o que confere polaridade e alta solubilidade em solventes aquosos e alcoólicos ([WIECZOREK P.P. et al., 2022](#); [SARAPA A. et al., 2025](#)). Além disso, a PROP também contém uma fração

significativa de compostos apolares, composta principalmente por terpenos e terpenóides, além de triterpenos como lupeol e β -amirina, que apresentam longas cadeias hidrocarbonadas hidrofóbicas (KASOTE D. et al., 2022; BALASUBRAMANIAM A.K. et al., 2025).

Entre os apolares, merece destaque o ARTC (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), pois apesar de possuir um grupo fenólico, sua estrutura é dominada por duas cadeias prenil hidrofóbicas, conferindo caráter lipofílico a molécula e baixa solubilidade aquosa (BESERRA F.P. et al., 2021).

4.5 Cryo-TEM

A análise morfológica das nanopartículas foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão em condições criogênicas (Cryo-TEM) no LNNano/CNPEM (Campinas-SP). As amostras foram aplicadas sobre grades de cobre recobertas com filme de carbono perfurado, previamente tratadas por descarga de brilho para aumentar a hidrofobicidade superficial. Em seguida, o excesso foi removido com papel filtro e as grades foram vitrificadas por imersão rápida em etano líquido resfriado com nitrogênio líquido, preservando a estrutura coloidal. As amostras vitrificadas foram analisadas a temperaturas criogênicas, e as imagens adquiridas foram avaliadas quanto à morfologia, homogeneidade e presença de agregados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Resultados dos estudos preliminares para seleção da melhor formulação

5.1.1 Comparação físico-químicos e %EE das Formulações F1-F4

Na análise comparativa quanto aos componentes da formulação (lipídeos e surfactante), as formulações F1 (injeção solvente) e F2 (emulsão-ultrassonicação), compostas por AE, AO e T80, apresentaram desempenho insatisfatório com $PDI > 0,400$ e desvio padrão elevado. Em contraste, F3 (injeção solvente) e F4 (emulsão-ultrassonicação), formuladas com MM, ACC e P188, apresentaram desempenho superior, com $PDI < 0,200$ e tamanhos < 130 nm, sendo considerados parâmetros ideais para continuidade. Os valores de PDI variam entre 0,0 (amostras perfeitamente uniformes) e 1,0 (amostras altamente polidispersas). Valores iguais ou inferiores a 0,2 são geralmente considerados adequados para nanopartículas poliméricas, enquanto em sistemas lipídicos, como lipossomas e nanolipossomas, valores de até 0,3 indicam boa homogeneidade da população de partículas (DANAIEI M. et al., 2018).

Nos testes de miscibilidade com os compostos ativos, a composição F4 também apresentou o melhor desempenho, reforçando a escolha desses componentes. Portanto, a combinação de MM, ACC e P188 se destaca como base ideal para o desenvolvimento de formulações estáveis e homogêneas.

Comparando-se os métodos de preparo (injeção de solvente e emulsão-ultrassonicação), os métodos para a mesma base lipídica (AE, AO e T80), a F1 (produzida por injeção de solvente) apresentou os piores resultados, $PDI > 0,700$, desvio padrão > 500 e tamanho de 450,6 nm, apesar de um ZP satisfatório de -14 mV. A F2, com os mesmos lipídeos, mas preparada por emulsão-ultrassonicação, teve PDI ainda insatisfatório (0,404), mas com tamanho reduzido (123,2 nm) e ZP de -5,43 mV (inferior ao da F1). Apesar disso, a F2 apresenta desempenho superior em termos de homogeneidade e redução de tamanho, sendo mais favorável no uso em aplicações terapêuticas.

Ao comparar F3 e F4, que utilizam os mesmos lipídeos (MM, ACC e P188), para observação da influência direta do método. A F3, produzida por injeção de solvente, apresentou bons resultados, com $PDI < 0,200$, tamanho < 130 nm e ZP de -6,43 mV. No entanto, a F4, preparada com emulsão-ultrassonicação, apresentou desempenho superior, com PDI de 0,160, tamanho semelhante e ZP mais estável de -12,8 mV. Portanto, o método de emulsão ultrassonicação foi consistentemente superior, não apenas com AE e AO, mas também com MM e ACC, sendo mais eficaz e ainda mais prático, com maior rendimento e menor complexidade operacional, sendo o método de escolha para continuidade.

Além da escolha do método, foi possível comparar a influência das combinações dos constituintes da formulação nos resultados, sendo assim, ficou evidente que a combinação de lipídeos MM, ACC e surfactante P188, se destacou nos resultados benéficos, sendo o de escolha para continuidade. Todos os detalhes estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação das formulações F1 a F4 pelos valores de índice de polidispersividade (PDI), tamanho hidrodinâmico (nm) e potencial zeta (ZP, mV)

Formulações	PDI	Tamanho (nm)	ZP (mV)
F1 (AE, AO, T80, Injeção solvente)	0,796 ± 568,5	450,6 ± 62,6	-14,0 ± 1,5
F2 (AE, AO, T80, Emulsão ultrassônica)	0,404 ± 50,2	123,2 ± 12,3	- 5,4 ± 0,9
F3 (MM, ACC, P188, Injeção solvente)	0,205 ± 0,01	126,0 ± 24,1	- 6,4 ± 0,1
F4(MM, ACC, P188, Emulsão ultrassônica)	0,160 ± 0,02	110,8 ± 16,3	-12,8 ± 0,2

Em relação à %EE, as formulações F3 e F4 (por terem apresentado melhores resultados) foram utilizadas como base para a incorporação inicial de compostos bioativos (ARTC) na concentração de 1,6 µM, originando as formulações F3_{ARTC} e F4_{ARTC}.

As formulações derivadas de F3, preparadas pelo método de injeção de solvente, apresentaram 0% de %EE. Já as formulações derivadas de F4, obtidas por emulsão-ultrassônica, apresentaram 100% de %EE (Fig. 5). Esses resultados demonstram que o método de preparo tem influência direta na eficiência de incorporação, mesmo quando a composição lipídica é mantida.

Dessa forma, a formulação F4 foi selecionada para continuidade do estudo por apresentar os resultados mais promissores entre todas as testadas, e deu-se continuidade com as pré formulações piloto.

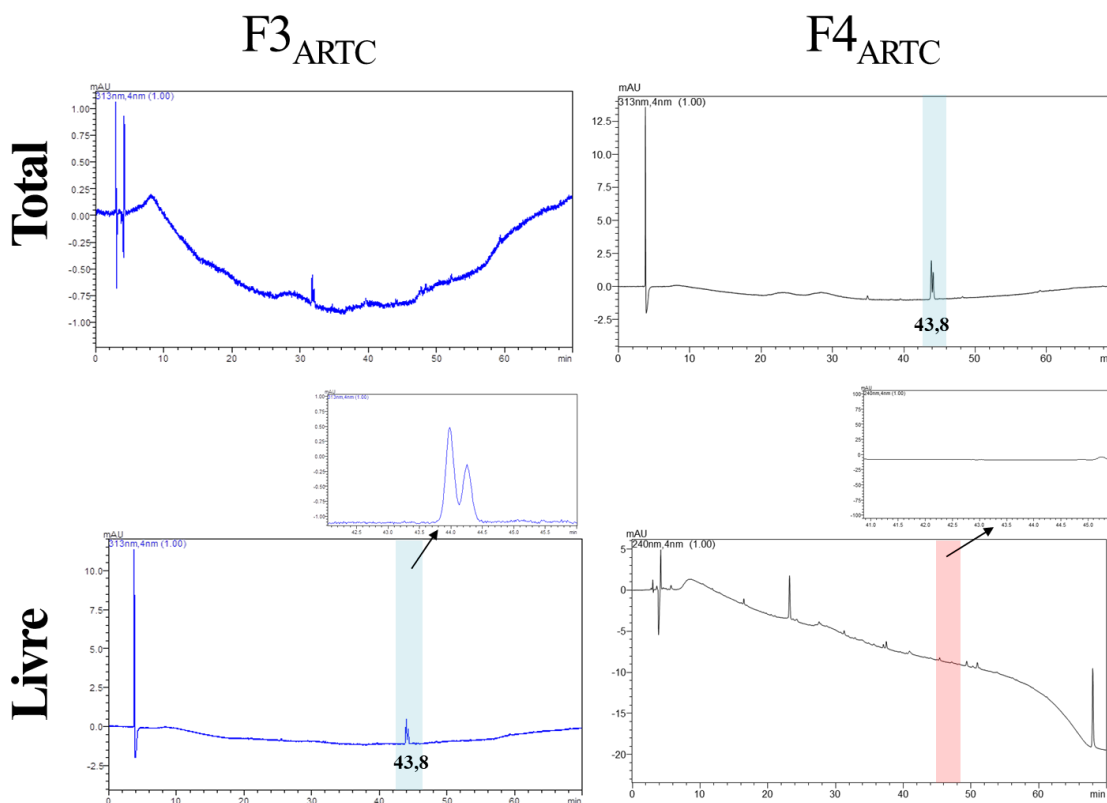


Figura 5. Cromatogramas obtidos das formulações F3_{ARTC} e F4_{ARTC} após processo de filtração para separação do ARTC livre e encapsulado. Os dados foram utilizados para cálculo da %EE e análise comparativa.

5.1.2 Miscibilidade dos compostos ativos com os lipídeos

O teste de miscibilidade foi realizado como análise complementar. A escolha adequada dos lipídeos é determinante para o sucesso na incorporação de ativos hidrofóbicos em sistemas nanoestruturados. A avaliação da miscibilidade entre o PROP e diferentes composições lipídicas indicou que as combinações contendo MM e ACC (combinações 4 a 6) apresentaram excelente compatibilidade (em conformidade com o HPLC), evidenciada por sistemas visualmente homogêneos, sem sinais de separação de fases, precipitação ou turvação, mesmo em concentrações crescentes de ativo (2% a 6%). Por outro lado, as combinações compostas por ácido esteárico (AE) e ácido oleico (AO) (combinações 1 a 3) demonstraram instabilidade visual, sugerindo baixa afinidade entre os lipídeos e o extrato (Tabela 3 e Fig. 6).

Esses resultados reforçam a importância da seleção criteriosa dos excipientes lipídicos durante o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados. Como destacado na literatura (HALLAN et al., 2025), que destaca que não são todos os lipídios que são adequados para diferentes ativos e devem ser pré-selecionados antes da formulação final. O que evidencia a necessidade de triagens iniciais para garantir a compatibilidade entre os componentes e a

estabilidade da formulação. Com base nesses achados, as combinações 4 a 6 foram selecionadas para as etapas subsequentes de desenvolvimento das nanopartículas lipídicas. Sendo assim, a utilização de screening visual, apesar de simples, mostrou-se eficaz para a seleção inicial das combinações mais promissoras, corroborando sua aplicabilidade em estágios iniciais de desenvolvimento de NLCs com extratos naturais.

Tabela 3. Resultado visual do teste de miscibilidade dos lipídeos com o extrato de própolis verde

Combinações	Observação Visual	Classificação
1 (2%)	Leve turvação e separação de fases	Ruim
2 (4%)	Precipitação e Separação de fases	Muito ruim
3 (6%)	Precipitação e Separação de fases	Muito ruim
4 (2%)	Homogênea	Boa
5 (4%)	Homogênea	Boa
6 (6%)	Homogênea	Boa

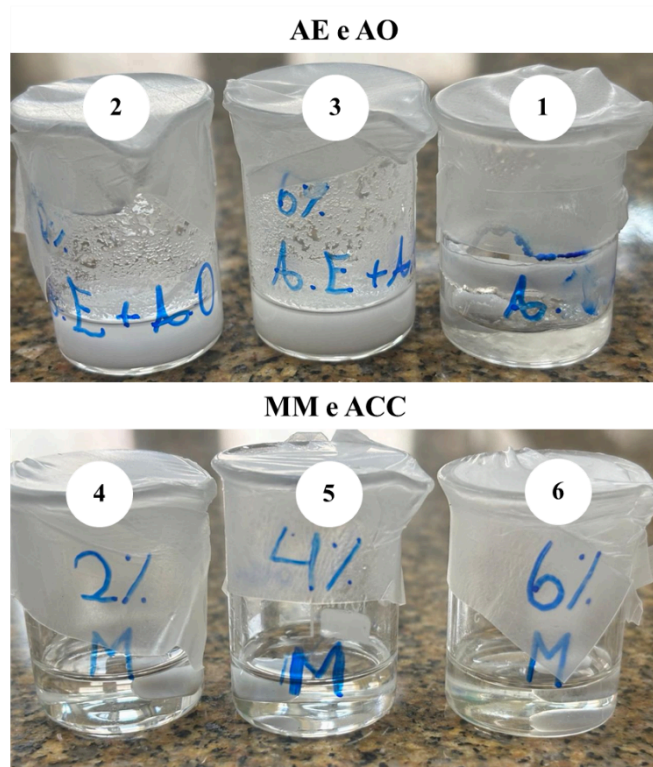


Figura 6. Resultado visual do teste de miscibilidade dos lipídeos com o extrato de própolis verde. 1. AE/AO (2%); 2. AE/AO (4%); 3. AE/AO (6%); 4. MM/ACC (2%); 5. MM/ACC (4%); 6. MM/ACC (6%).

5.2 Resultados da formulação selecionada

Nessa fase, foram realizadas as formulações pilotos com baixas concentrações dos ativos.

5.2.1 Eficiência de encapsulamento e estabilidade coloidal das NLCs

Devido à sua baixa solubilidade em água e limitada biodisponibilidade, o PROP e o ARTC requerem estratégias que aumentem sua aplicabilidade terapêutica. Uma abordagem promissora é sua encapsulação em NLCs, que oferece um ambiente lipídico favorável para melhorar a estabilidade e a biodisponibilidade do fármaco (KHAN S. et al., 2015).

A análise da eficiência de encapsulamento revelou uma taxa elevada de encapsulação do ARTC, superior a 95%. Esse resultado pode ser atribuído à forte afinidade entre o ARTC e os componentes lipídicos, impulsionada por sua natureza lipofílica, o que favorece sua interação com a matriz lipídica e minimiza sua exposição ao meio aquoso (PAZIN W.M. et al., 2021). Esses resultados estão de acordo com relatos da literatura envolvendo compostos hidrofóbicos semelhantes, nos quais o ambiente lipídico demonstrou facilitar a estabilização e o encapsulamento (CARVALHO F.V. de et al., 2022). A compatibilidade química entre o fármaco e a matriz lipídica provavelmente contribui para a formação de um nanossistema estável, resultando em maior estabilidade e biodisponibilidade do ARTC.

Para avaliar mais detalhadamente as propriedades coloidais das formulações desenvolvidas, foram analisados o tamanho de partícula, o índice de polidispersão (PDI), o potencial zeta (ZP) e a eficiência de encapsulação (%EE). Conforme apresentado na Tabela 4, os resultados mostraram-se promissores, com tamanhos médios entre 110 e 115 nm, valores dentro da faixa nanométrica, oferecendo benefícios terapêuticos e permanecendo estáveis durante todo o período analisado. Em relação ao PDI, as amostras de NLC apresentaram valores dentro da faixa aceitável ($< 0,3$), indicando boa uniformidade e ausência de variações significativas ao longo do tempo.

O potencial zeta (ZP), parâmetro importante para avaliar a estabilidade coloidal e possíveis agregações por repulsão eletrostática (GORDILLO-GALEANO A. et al., 2021), apresentou valores entre -12 e -21 mV. Apesar de pequenas variações, esses valores estão dentro do esperado, não indicando instabilidades relevantes.

Adicionalmente, a análise visual (Fig. 7) não evidenciou formação de sedimentos, aglomerados, alteração de coloração ou formação de gel durante todo o período de observação. Esses resultados, aliados à estabilidade do tamanho e do PDI, reforçam a ausência de sedimentados e a boa estabilidade físico-química das formulações.

A eficiência de encapsulação (%EE), determinada por HPLC e quantificada através da curva de calibração (Fig. 8) do marcador químico ARTC, que apresentou tempo de retenção de 43,8 min (nas condições com acetonitrila) (Fig. 9), indicou encapsulação total (100%), uma vez que não foram observados picos de retenção correspondentes ao composto livre

(Fig. 10). Na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a separação dos compostos ocorre em função de suas interações com duas fases, sendo elas a fase móvel, composta por solventes orgânicos, e a fase estacionária, geralmente constituída por uma coluna de sílica modificada (como C18), de caráter apolar. Em sistemas de fase reversa, como o utilizado neste estudo, compostos mais apolares tendem a interagir mais fortemente com a fase estacionária e, portanto, apresentam maior tempo de retenção, enquanto substâncias polares eluem mais rapidamente. O Artepillin C, por ser um composto lipofílico e pouco polar, apresentou tempo de retenção elevado, confirmando sua natureza hidrofóbica e a eficiência da separação cromatográfica. O valor de encapsulação permaneceu inalterado após 190 dias de armazenamento a 25 °C. As informações detalhadas referentes a esses parâmetros estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados da caracterização DLS e estabilidade ao longo de 190 dias das formulações de NLCs em termos de tamanho, PDI, ZP e %EE.

Formulações		Tempo (dias)					190
		1	31	62	110	132	
PDI	NLCC	0,160±0,007	0,168±0,017	0,162±0,013	0,144±0,019	0,145±0,015	0,138±0,039
	NLCA	0,138±0,027	0,181±0,012	0,173±0,002	0,147±0,013	0,106±0,015	0,138±0,028
	NLCP	0,142±0,025	0,18 ±0,020	0,177±0,006	0,126±0,009	0,140±0,004	0,134±0,042
Tamanho (nm)	NLCC	110,8±16,4	86,52±28,64	87,22±23,35	106,3±0,69	113,4±2,36	119,6±4,2
	NLCA	115,3±2,9	99,28± 9,18	85,42±13,82	111,1±5,38	124,5±7,13	95,7±37,8
	NLCP	115,7±10,9	108,8±6,18	77,46±19,19	111,7±7,29	114,1±4,05	99,2±1,40
ZP (mV)	NLCC	-12,8±0,2	-18,7± 0,85	-12,2±1,04	-7,91±0,23	-6,10±0,44	-8,95±0,34
	NLCA	-14,1±0,2	-9,75± 0,04	-14,4±0,41	-10,3±1,14	-5,56±0,17	-11,8±0,92
	NLCP	-21,4±0,4	-16,5±0,6	-12,9 ± 0,7	-9,2 ± 0,5	-9,7 ± 0,3	-13.1 ± 0.6
EE (%)	NLCC	-	-	-	-	-	-
	NLCA	100%	-	-	-	-	100%
	NLCP	100%	-	-	-	-	100%



Figura 7. Análise visual das formulações NLCs controle (NLC_C), com própolis (NLC_P) e Artepillin C (NLC_A) ao longo de 190 dias.

Curva Artepillin C (240 nm)	
Concentração (µM)	Absorbância (mAU)
154,3	3446340,33
94,3	2071629,67
23,57	369355,67
11,8	185988,00
5,9	66364,33
2,9	39021,67

Curva de Calibração Artepillin C

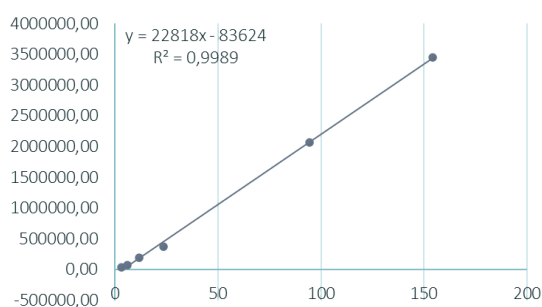


Figura 8. Curva de calibração do marcador químico Artepillin C (ARTC) obtida a 240 nm, relação linear entre a concentração (µM) e a absorbância (mAU), descrita pela equação da reta $y = 22818x - 83624$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9989$.

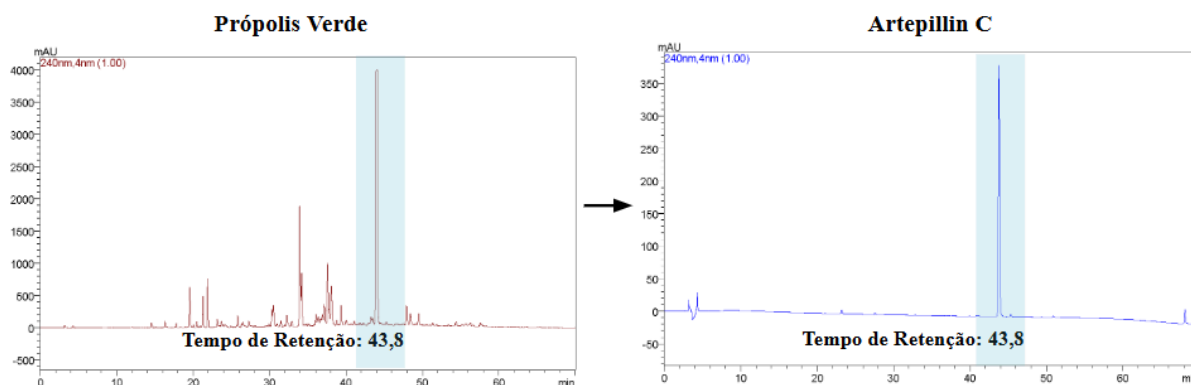


Figura 9. Espectros HPLC no tempo de retenção da ARTC (43,8 min).

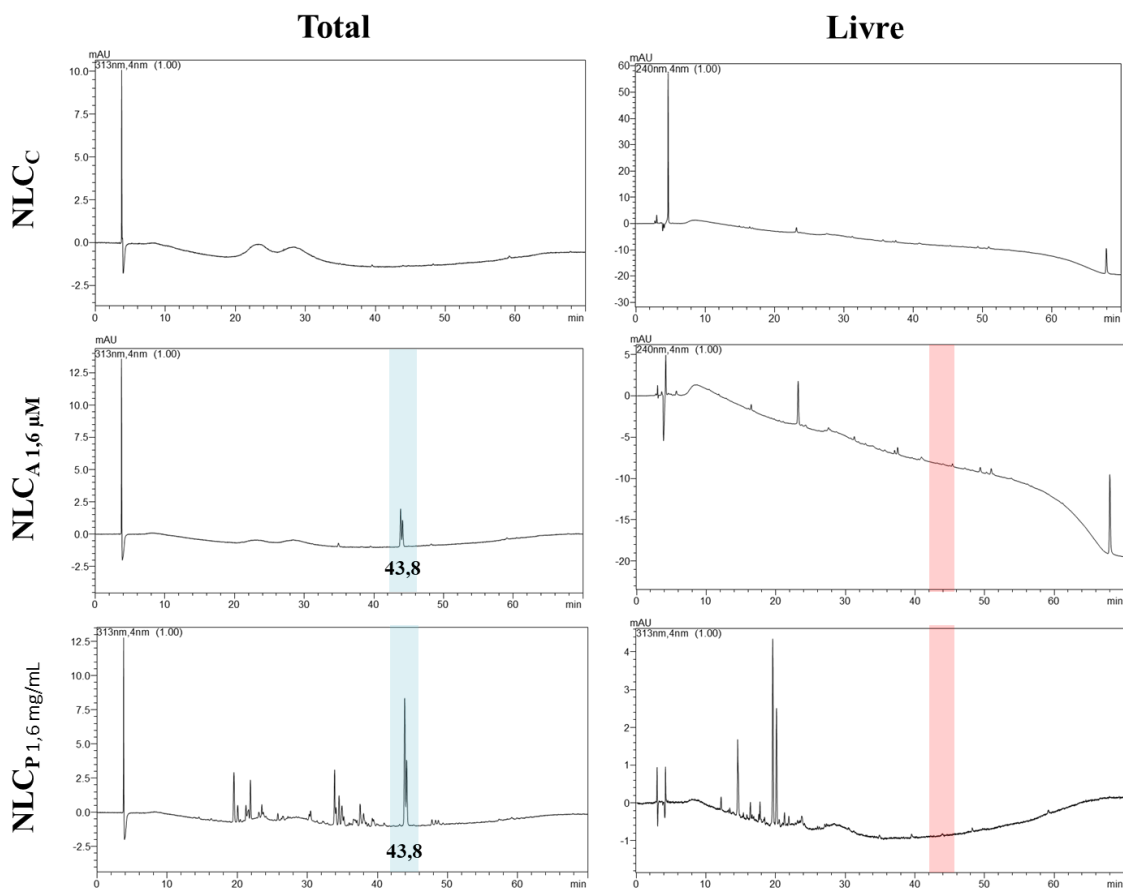


Figura 10. Espectro HPLC das amostras NLCs sem ativo (NLC_C) e com ativos NLC_A 1,6 μ M e NLC_P 1,6 mg/mL, apresentando o pico de retenção da Artemillin C para as formulações encapsuladas.

5.2.2 Determinação do Tamanho e Quantificação de NLCs por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

As medições de tamanho de partícula obtidas por DLS foram complementadas por análises via NTA, que forneceram dados adicionais sobre a distribuição de tamanho. Os diâmetros médios no primeiro dia de síntese, determinados por DLS, foram de 110,8 nm para a formulação NLC_C , 115,3 nm para a NLC_A e 115,7 nm para a NLC_P , enquanto as análises por NTA indicaram valores ligeiramente maiores, de 149,7 nm, 162,5 nm e 158,6 nm, respectivamente (Tabela 5). Apesar dessas diferenças, os valores permanecem dentro da faixa nanométrica aceitável.

A discrepância entre os resultados obtidos por NTA e DLS está relacionada aos diferentes princípios de medição de cada técnica. Embora ambas utilizem a equação de Stokes-Einstein para estimar o diâmetro hidrodinâmico, o NTA rastreia partículas individualmente, monitorando o movimento browniano por meio da iluminação a laser e da detecção óptica de suas trajetórias, enquanto o DLS mede as flutuações da intensidade da luz espalhada por um conjunto de partículas em suspensão (MCCOMISKEY K.P.M. et al., 2018;

HOLE P. et al., 2013). Assim, as duas técnicas são complementares e frequentemente empregadas em conjunto na caracterização de nanopartículas.

Além de confirmar o tamanho das partículas, o NTA permitiu a determinação da concentração de nanopartículas. As concentrações obtidas foram de 10×10^{13} partículas/mL para NLC_C, $7,63 \times 10^{13}$ partículas/mL para NLC_A e $9,36 \times 10^{13}$ partículas/mL para NLC_P (Tabela 5), indicando alta densidade de partículas, característica essencial para a entrega eficaz de compostos bioativos, mantendo a proporção lipídica. Esse comportamento foi previamente descrito em sistemas semelhantes (GUILHERME V.A. et al., 2019), nos quais a organização molecular das NLCs permite a integração dos ativos à matriz lipídica sem alterar significativamente o tamanho médio das partículas. Esses resultados reforçam a importância da quantificação de nanopartículas na avaliação do comportamento das formulações e seu potencial para aplicações biomédicas.

A análise por NTA também possibilitou o cálculo da distribuição de tamanho das partículas, a partir da qual se obtém o índice SPAN (Eq. 1). Esse parâmetro reflete a largura da distribuição de tamanhos, sendo valores inferiores a 1,0 amplamente reconhecidos como indicativos de boa uniformidade e homogeneidade do sistema (HOLE P. et al., 2013). No presente estudo, os valores de SPAN encontrados foram de 0,77 para NLCC, 0,81 para NLCA (1,6 µM) e 0,61 para NLCP (1,6 mg/mL) (Tabela 5), demonstrando que todas as formulações apresentaram distribuição de tamanho adequada, ainda que com pequenas variações entre os sistemas.

Esses achados estão em conformidade com o estudo de CARVALHO F.V. de et al. (2022), no qual NLCs contendo óleo de copaíba e docetaxel também apresentaram valores de SPAN abaixo de 1,0 via NTA, confirmando que o SPAN é um parâmetro robusto de caracterização da uniformidade em NLCs. Assim, ele atua de forma complementar ao PDI obtido por DLS, fortalecendo a interpretação conjunta da qualidade das formulações desenvolvidas.

Tabela 5. Caracterização DLS das formulações de NLC em termos de tamanho (nm) e concentração (partícula/mL) das formulações controle (NLC_C) e com ativos (NLC_{A 1,6 µM}) e (NLC_{P 1,6 mg/mL})

Formulação	Tamanho de partícula (nm)	Concentração ($\times 10^{13}$ particles/mL)	SPAN
NLC _C	149,7 ± 3.1	10.0 $\times 10^{13}$ ± 0.11	0,77 ± 0,04
NLC _{A 1,6 µM}	162,5 ± 1.2	7.63 $\times 10^{13}$ ± 0.17	0.81 ± 0,03
NLC _{P 1,6 mg/mL}	158.6 ± 1.8	9.36 $\times 10^{13}$ ± 0.11	0,61 ± 0,04

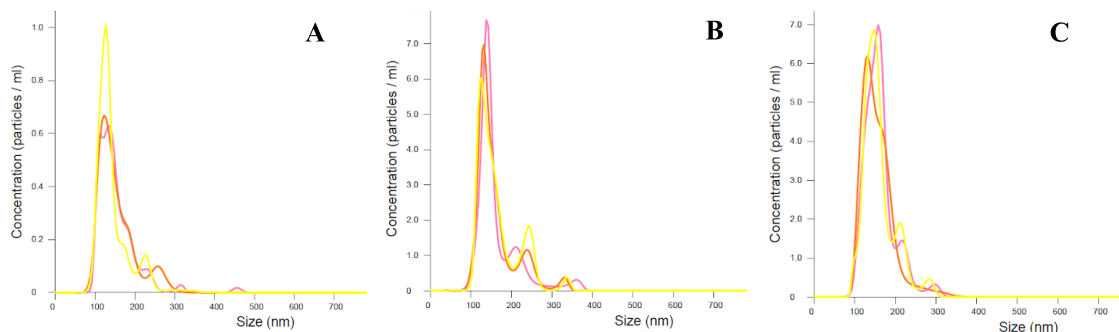


Figura 11. Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) dos Nanocarreadores Lipídicos Nanoestruturados (NLCs), mostrando a distribuição de tamanho e concentração de partículas, obtida em triplicata. Em concentração (partículas/mL) por tamanho das partículas (nm). (A)NLC_c; (B) NLC_A, 1,6 μM; (C) NLC_P, 1,6 mg/mL.

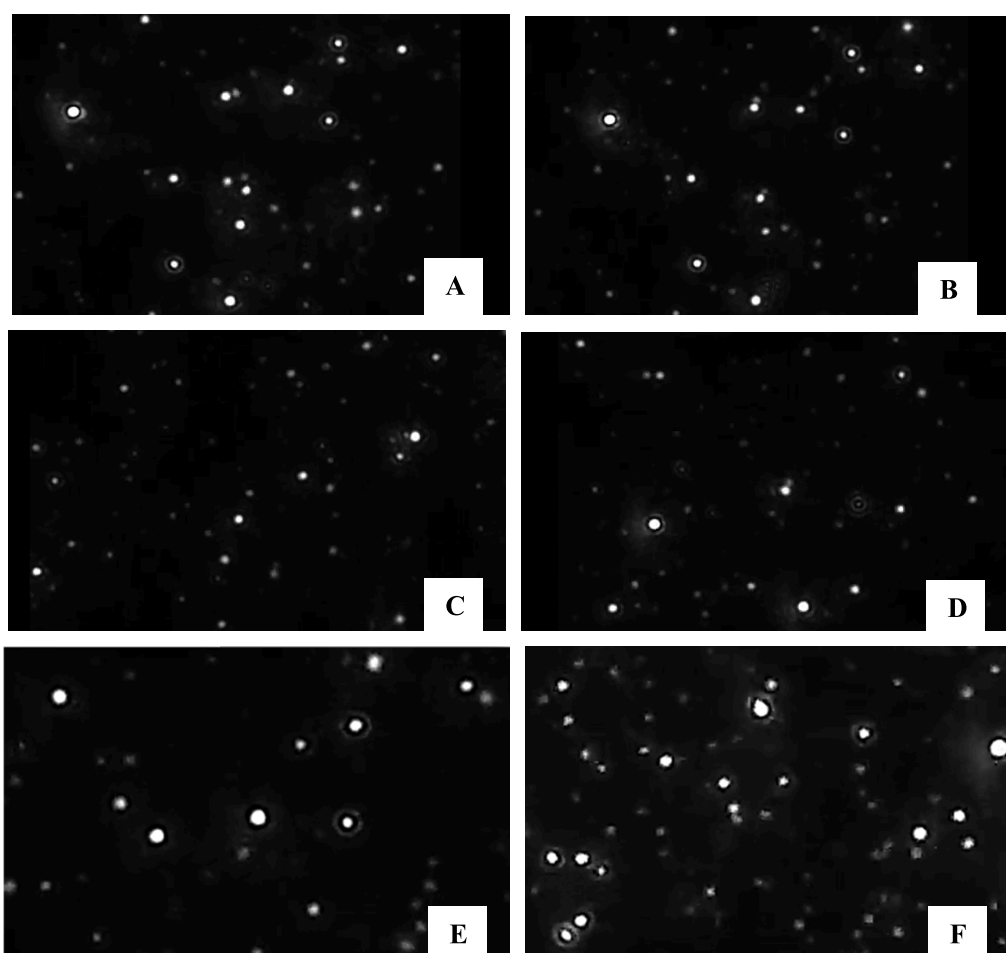


Figura 12. Imagens do vídeo em tempo real de 10 segundos de nanopartículas, obtidas por NTA, foram registradas no 1º e no 8º segundo. A) NLC_c(1st); B) NLC_c(8th); C) NLC_A 1,6 μM (1st); D) NLC_A 1,6 μM (8th); E) NLC_P 1,6 mg/mL (1st) and F) NLC_P 1,6 mg/mL (8th).

5.2.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR (Fig. 13 a Fig. 14) foi empregado para identificar os principais grupos funcionais presentes nos componentes da formulação lipídica (MM, ACC e P188), os

compostos bioativos livres (PROP e ARTC) e as amostras de NLC_C e encapsuladas para investigar possíveis interações intermoleculares decorrentes da encapsulação da PROP e ARTC. Os espectros dos componentes livres foram interpretados para identificar suas bandas de absorção características e a Tabela 6 resume as principais bandas observadas.

5.2.3.1 Interação dos componentes da formulação

Quando comparado os componentes da formulação (MM, ACC, P188) com a amostra da NLCC (Fig. 16), verificamos que a matriz lipídica (lípidos sólidos, MM e líquidos, ACC) apresenta bandas típicas de ceras com absorções fortes a 2920 e 2850 cm⁻¹ atribuídas ao estiramento assimétrico e simétrico de CH₂; banda intensa em 1740 cm⁻¹ relacionada ao estiramento da carbonila (C=O) dos ésteres de ácidos graxos; banda de deformação de CH₂ em 1460 cm⁻¹ e bandas de C–O entre 1160 e 1100 cm⁻¹. O sinal a 721 cm⁻¹ corresponde à oscilação de balanço de CH₂. Essas bandas são típicas de lipídeos e confirmam a ausência de grupos aromáticos (INVERNIZZI et al., 2018).

O surfactante P188 apresenta espectro dominado pelo estiramento C–O–C dos blocos polioxipropileno (PPO) e polioxietileno (PEG) (Fig. 13) em 1100 e 1040 cm⁻¹ e bandas de CH₂/CH₃ em 2880–2860 cm⁻¹. Além da ausência de carbonilas, essas características distinguem o surfactante da matriz lipídica.

O espectro da NLCC resulta da sobreposição das bandas da matriz lipídica e do P188. As bandas de CH₂ (2920/2850 cm⁻¹), carbonila (1740 cm⁻¹), cisalhamento de CH₂ (1460 cm⁻¹), C–O (1160–1100 cm⁻¹) e balanço de CH₂ (721 cm⁻¹) permanecem praticamente inalteradas, indicando que a formulação base não contém compostos aromáticos significativos, o que sugere ausência de compostos fenólicos. Além disso, observa-se que o surfactante se associa apenas fisicamente ao lipídio.

Devido às bandas características do lipídio (C–H em 2850–2920 cm⁻¹ e C=O em 1730 cm⁻¹) permanecerem praticamente inalteradas, sem deslocamentos relevantes ou formação de novas bandas, infere-se que não ocorreu ligação química entre o surfactante e a matriz lipídica. Na NLCC, as bandas do surfactante (como C–O–C em 1100 cm⁻¹) também se mantiveram, mostrando que ele foi incorporado sem alterações estruturais.

As pequenas mudanças observadas foram apenas de intensidade ou largura de pico, típicas de interações físicas fracas, como forças de van der Waals e pontes de hidrogênio. Assim, pode-se concluir que o surfactante está associado fisicamente à matriz lipídica, sem formação de novas ligações covalentes, o que está de acordo com estudos prévios em NLC/SLN (GUPTA et al., 2017; MÜLLER et al., 2007; PARDEIKE et al., 2009).

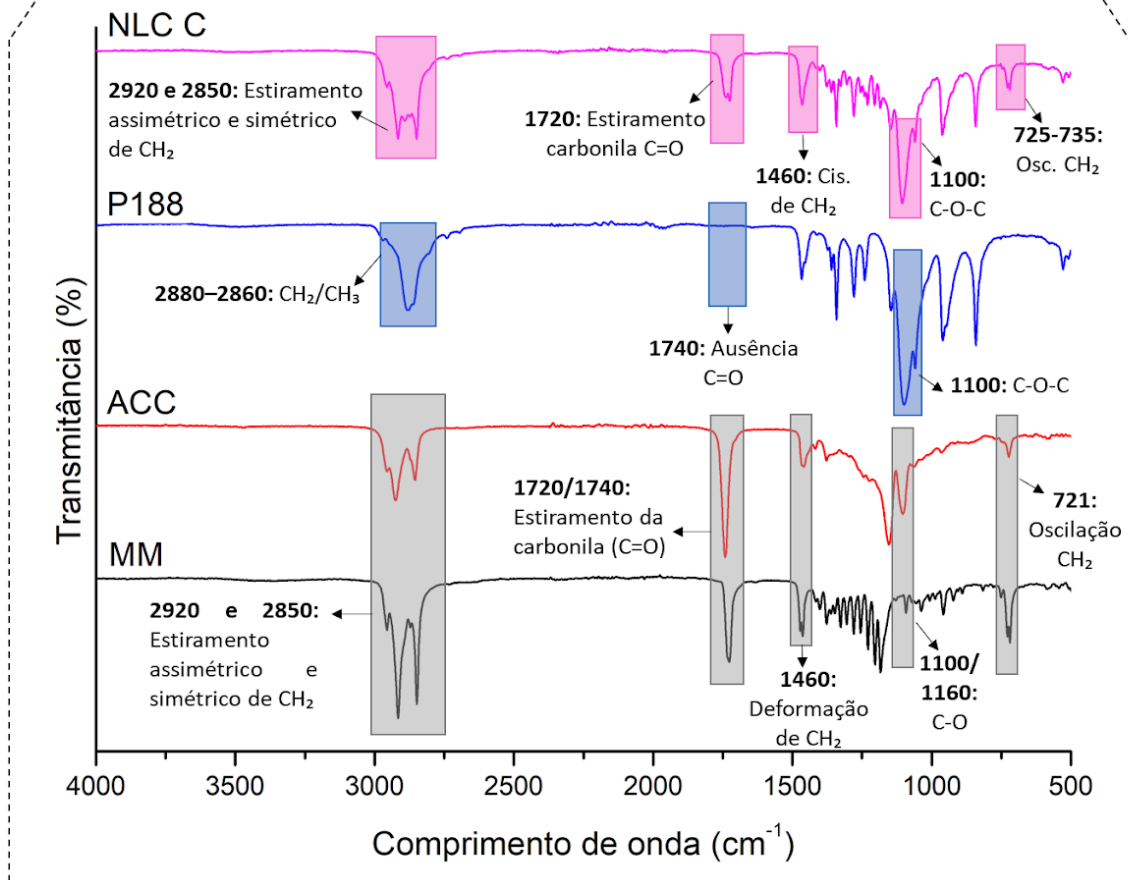
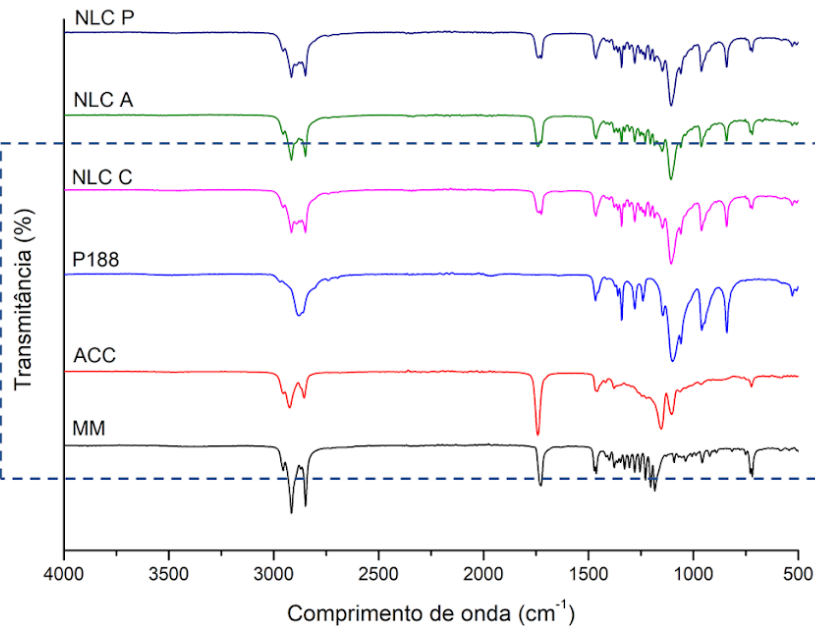


Figura 13. Espectros de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos componentes da formulação (MM, P188, ACC) e das amostras de Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (NLC_C, NLC_A e NLC_P). Os espectros mostram as principais bandas de absorção correspondentes aos estiramentos e deformações características dos grupos funcionais presentes em cada amostra, em transmitância (%) por comprimento de onda (cm⁻¹).

Tabela 6. Análise das principais bandas de absorção no espectro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) das amostras MM, ACC, P188 e NLC_C, indicando os comprimentos de onda (cm⁻¹) e as respectivas atribuições vibracionais dos grupos funcionais característicos

Amostras	Principais bandas FTIR (cm ⁻¹)
MM	2920, 2850 (Estiramento simétrico e assimétrico CH ₂)
	1740 (Estiramento de carbonila C=O de ésteres)
	1462 (Deformação CH ₂)
	1160–1100 (Banda C–O)
	721 (oscilação CH ₂)
ACC	2920, 2850 (Estiramento simétrico e assimétrico CH ₂)
	1745 (Estiramento C=O)
	1478/1468 (Cisalhamento de CH ₂)
	1183 (Banda C–O)
	735/725 (Balanço CH ₂)
P188	2880–2860 (Bandas CH ₂ /CH ₃)
	1100–1040 (C–O–C de polioxietilenos)
NLC _C	2920, 2850 (Estiramento CH ₂)
	1740 (C=O)
	1460 (CH ₂)
	1160–1100 (C–O)
	721 (CH ₂)

5.2.3.2 Interação dos compostos bioativos com as NLCs

De acordo com a literatura, a PROP apresenta bandas características em 775 e 1221 cm⁻¹ (vibrações fora do plano de anéis aromáticos e estiramento C–O), um grupo de picos em torno de 1033, 1445, 1603 e 1688 cm⁻¹ associados a estiramentos C–O, C=C e C=O de polifenóis aromáticos, estiramentos O–H e N–H em 3309 e 2929 cm⁻¹. Já a ARTC, principal componente fenólico da própolis brasileira, por ser um derivado prenilado do ácido

cinâmico, exibe espectro semelhante. Banda larga de O-H (3300 cm^{-1}), um grupo de picos carbonílicos em $1688\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, vibrações aromáticas em $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ e bandas C-O entre 1220 e 1000 cm^{-1} . Sendo possível verificar no espectro dos ativos (ARTC e PROP, Fig. 14) (PEZESHKI A. et al., 2014; ABDULLAH N.A. et al, 2019).

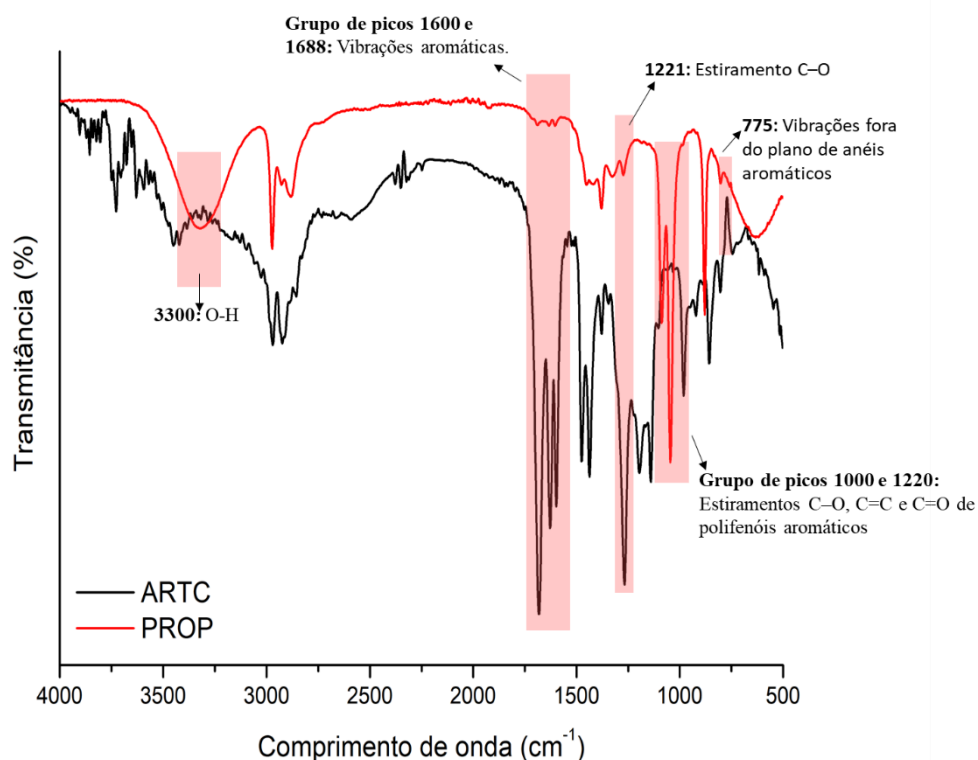


Figura 14. Espectros de FTIR das amostras ARTC e PROP, evidenciando as principais bandas de absorção associadas aos grupos funcionais característicos.

Porém quando fazemos comparação desses compostos bioativos livres com NLCs encapsuladas (NLC_P $1,6\text{ mg/mL}$ e NLC_A $43,7\text{ }\mu\text{M}$) (Fig. 15A), não foi possível identificar de forma nítida as bandas características dos compostos bioativos nas regiões esperadas (por exemplo, as vibrações aromáticas em torno de $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ e os estiramentos C-O em $1220\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$). A ausência desses sinais marcantes pode estar associada à baixa concentração de PROP e ARTC nas amostras (pilotos) analisadas, de modo que as intensidades dos picos dos ativos se aproximam do ruído de fundo da matriz lipídica. Assim, os resultados indicam que, nas concentrações prévias testadas, não se observam evidências espectroscópicas robustas de interações químicas entre os ativos e os componentes das NLCs. Em formulações futuras com maior concentração de PROP ou ARTC, espera-se que as

bandas específicas dos ativos se tornem mais evidentes, possibilitando avaliar melhor eventuais interações e alterações no ambiente lipídico proporcionadas pela incorporação dessas moléculas. Portanto, a presença de PROP e ARTC foi confirmada pela análise quantitativa (HPLC/UV). Ainda assim, algumas modificações discretas e sutis podem ser notadas, como discutido na Fig. 15B.

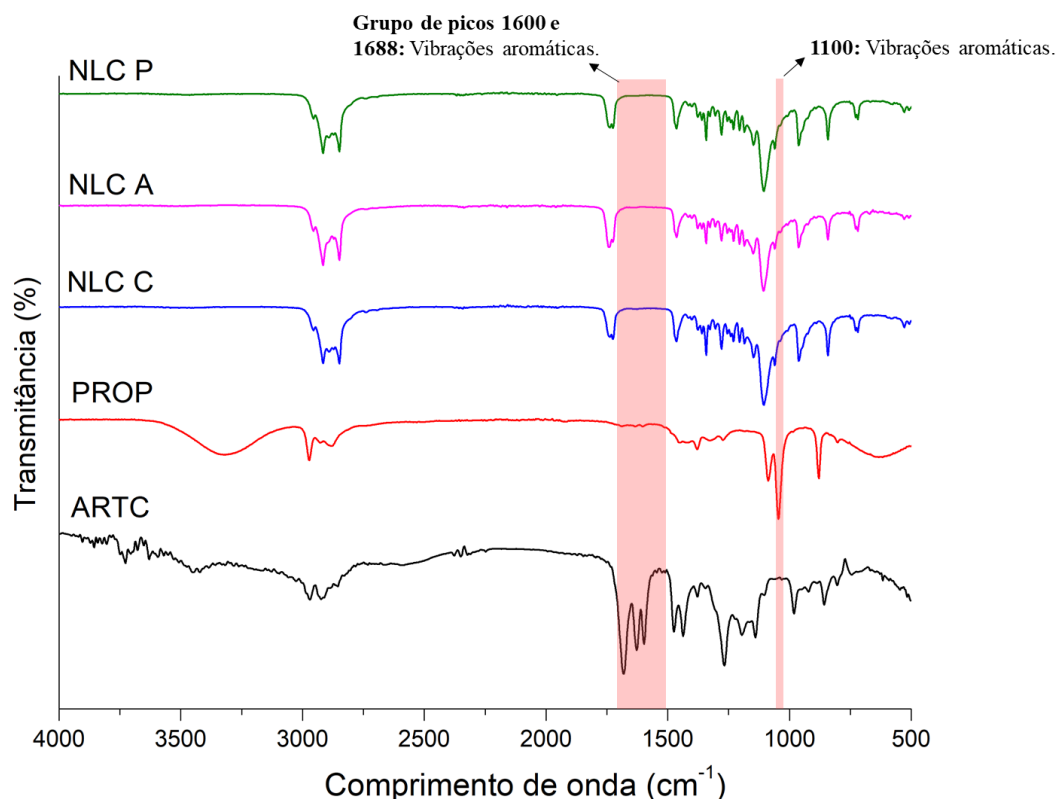


Figura 15A. Espectros FTIR comparando amostras com ativos livre (PROP e ARTC), controle (NLC_C) e ativos encapsulados (NLC_A e NLC_P).

Porém na região característica das vibrações aromáticas (entre 1600 a 1800 cm⁻¹), podemos identificar diferenças sutis, porém relevantes entre as amostras (Fig. 15.B). Observa-se aumento da intensidade nos espectros das formulações NLC_A e NLC_P em relação ao controle (NLC_C). Esse efeito decorre da sobreposição das bandas da matriz lipídica com as vibrações aromáticas dos compostos encapsulados (ARTC e PROP), que contribuem adicionalmente para a absorção nessa faixa, provocando um deslocamento discreto em comparação com a ARTC.

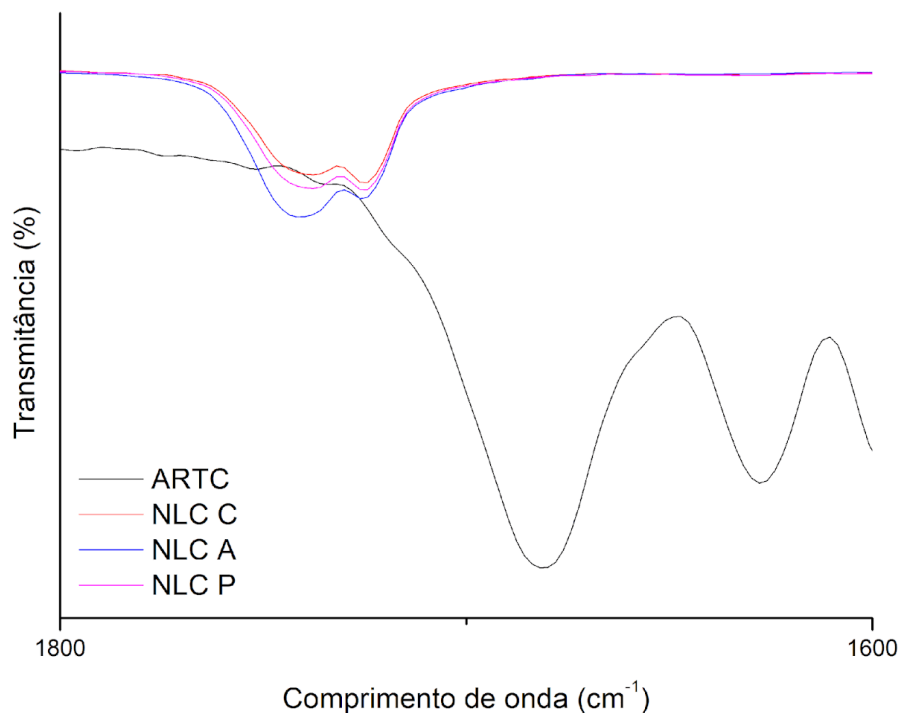


Figura 15B. Espectros FTIR destacando as interações entre as amostras controle (NLC_C) e encapsulados (NLC_A e NLC_P).

5.2.4 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman foi empregada para investigar possíveis interações moleculares entre a matriz lipídica e os compostos bioativos incorporados nos carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs). A Figura 16 apresenta os espectros Raman das formulações NLC controle (NLC_C), NLC contendo extrato de própolis verde (NLC_P) e NLC contendo Artepillin C (NLC_A).

Todas as formulações exibiram bandas Raman características dos componentes lipídicos, particularmente na faixa de aproximadamente 2850–2950 cm⁻¹, correspondentes às vibrações de estiramento C–H dos grupos metileno e metil, e em 1440 cm⁻¹, atribuída às vibrações de flexão CH₂ das cadeias de ácidos graxos. Os picos observados em torno de 1650 cm⁻¹ e 1740 cm⁻¹ estão associados, respectivamente, ao estiramento C=C de lipídios insaturados e ao estiramento C=O de grupos éster, confirmando a integridade da matriz lipídica composta por miristato de miristila e ácido caprílico/cáprico.

Nas amostras NLC_P e NLC_A, foram observadas variações adicionais de intensidade e novas características em relação ao controle, indicando a incorporação bem sucedida dos compostos fenólicos provenientes da própolis e da Artepillin C. O aumento de intensidade

próximo a 1600 cm^{-1} está relacionado ao estiramento aromático C=C, típico de estruturas fenólicas e flavonóides presentes na própolis verde. De modo semelhante, a banda na região de $1200\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ pode ser atribuída aos estiramentos C–O e C–C em sistemas polifenólicos.

Para a formulação NLC_A, deslocamentos sutis e aumento de intensidade na região de $1620\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ sugerem a presença da Artepillin C, cuja assinatura Raman inclui vibrações proeminentes do anel aromático e estiramento conjugado C=C, característicos de sua estrutura de ácido cinâmico prenilado. Esses achados indicam que o composto ativo foi incorporado com sucesso na matriz lipídica, sem causar perturbações significativas na ordem cristalina dos lipídios.

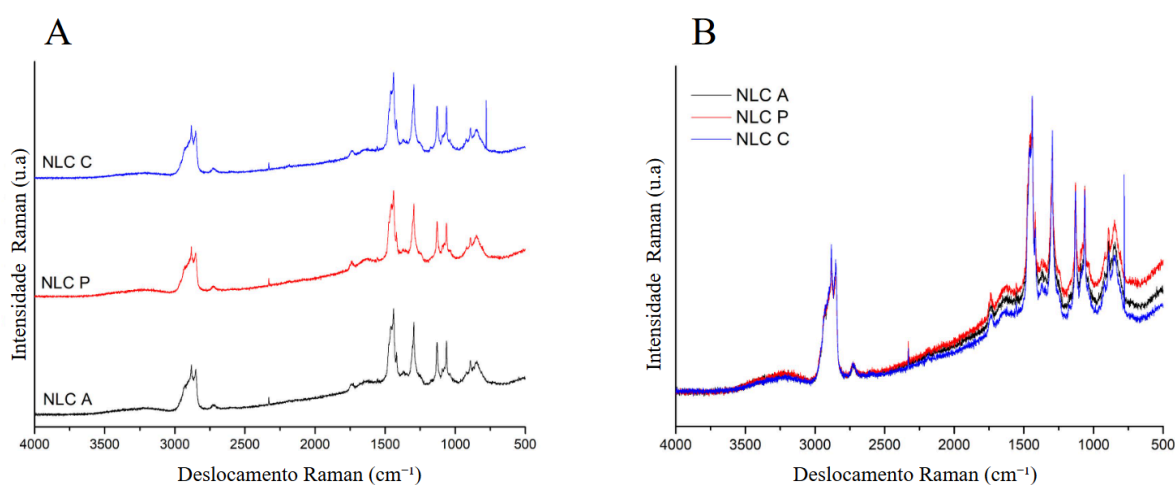


Figura 16. Espectros Raman dos carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs). (A) Espectros individuais do NLC_C (azul), NLC_P (vermelho) e NLC_A (preto). (B) Espectros sobrepostos para comparação direta dos perfis vibracionais do NLC_C (azul), NLC_P (vermelho) e NLC_A (preto).

5.2.5 Difração de Raio X (DRX)

Para fornecer informações sobre a estrutura cristalina dos componentes sólidos da formulação (MM e P188) e seu impacto na formulação das mesmas, foram realizadas análises de difração de raios X em pó (DRX). Conforme mostrado nos padrões de difração (Figura 17), as matérias-primas usadas na síntese (MM e P188) exibem estruturas cristalinas. Os picos de difração (Tabelas 7 e 8) para MM foram observados em $6,93^\circ$, $23,81^\circ$ e $40,66^\circ$, consistentes com uma matriz lipídica altamente cristalina. Esses picos correspondem à forma polimórfica β' , com valores de espaçamento de 0,63 nm, 0,37 nm e 0,22 nm, respectivamente, que permaneceram inalterados após a síntese de NLC. Essa preservação da fase β' destaca a

estabilidade estrutural do MM durante o processo de formulação, conforme também relatado na literatura (MURACA et al., 2023; WEISS et al., 2008).

O P188, em contraste, apresentou dois picos principais em $19,18^\circ$ e $23,40^\circ$, indicativos de uma estrutura parcialmente cristalina, consistente com seu papel como estabilizador (QIU et al., 2019; EMANUELE; BALASUBRAMANIAM, 2014).

As formulações de NLCs exibiram diferenças estruturais significativas. NLCC mostrou picos de difração principais em $6,89^\circ$, $13,68^\circ$, $18,99^\circ$, $23,69^\circ$ e $36,18^\circ$, indicativos de uma matriz cristalina altamente ordenada. A organização lamelar foi evidente nos picos em $18,99^\circ$ e $23,69^\circ$, pois estes são característicos de estruturas lipídicas ordenadas (RODENAK-KLADNIEW et al., 2021).

A adição de própolis (NLC_P 1,6 mg/mL) resultou em mudanças notáveis na intensidade e posição do pico, particularmente em $19,00^\circ$ e $23,66^\circ$, sugerindo interações moleculares entre os compostos fenólicos da própolis e a matriz lipídica. Essas interações provavelmente levaram a uma redução na cristalinidade do sistema. Efeitos semelhantes foram observados em sistemas NLC híbridos onde componentes bioativos induzem imperfeições estruturais (LIU et al., 2011; FERREIRA et al., 2021).

Por outro lado, a incorporação de ARTC (NLC_A 43,7 μ M) causou mudanças mais sutis, com menores impactos nos picos em $19,02^\circ$ e $23,37^\circ$, indicando que este composto interage menos com a matriz lipídica, preservando sua organização cristalina.

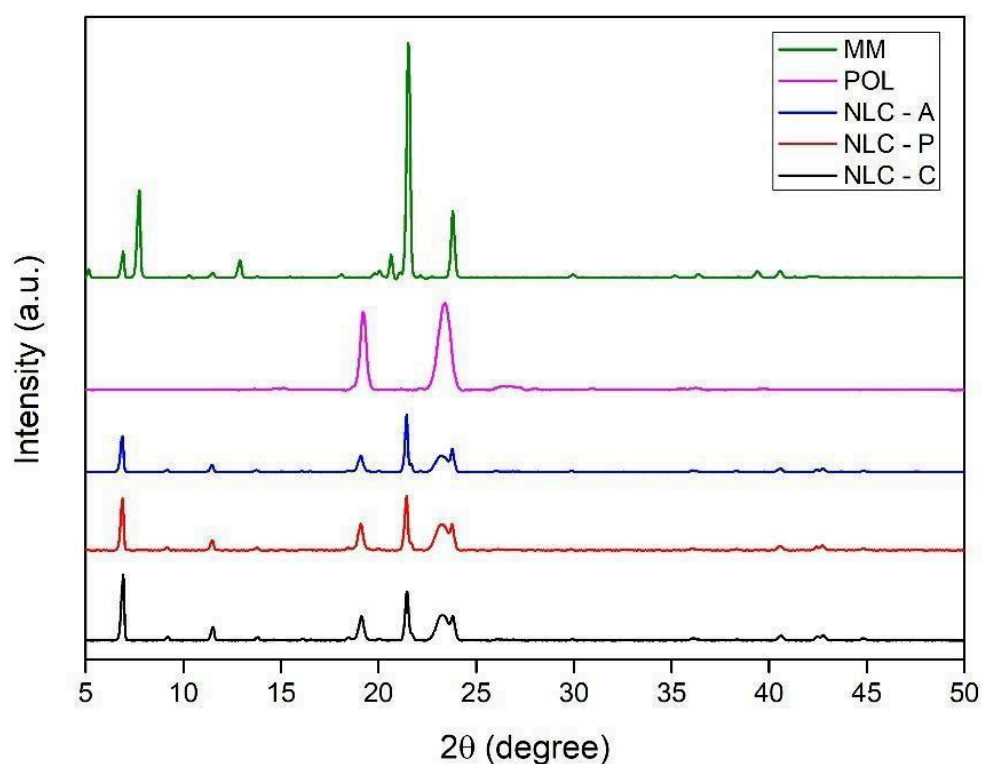


Figura 17. Difractogramas de raios X (DRX) dos componentes sólidos e das formulações de NLCs. O componente lipídico MM é indicado em verde; o tensoativo Poloxamer 188 (POL) em rosa; a formulação NLCC em azul; a formulação NLCP em vermelho e a formulação NLCA em preto.

Tabela 7. Posições dos picos de difração (2θ) dos componentes e das formulações de NLCs obtidas por DRX

Componente	2 θ Posição (°)
NLCC	6,89°; 9,20°; 11,46°; 13,68°; 18,99°; 21,44°; 23,69°; 29,94°; 36,18°; 40,75°; 42,63°; 44,95°
NLCA	6,85°; 9,20°; 11,49°; 13,67°; 19,02°; 21,42°; 23,37°; 29,98°; 36,17°; 40,48°; 42,60°; 44,94°
NLCP	6,84°; 9,14°; 11,46°; 13,68°; 19,00°; 21,40°; 23,66°; 29,68°; 36,21°; 40,59°; 42,58°; 44,95°
MM	6,93°; 7,42°; 11,47°; 18,08°; 20,09°; 21,50°; 23,81°; 30,01°; 35,16°; 39,13°; 40,66°; 42,25°
P188	19,18°; 23,40°

Tabela 8. Posições dos picos, ângulos θ correspondentes e espaçamentos interplanares d dos componentes puros e das formulações de NLCs, determinados por difração de raios X ($\lambda = 0,154$ nm)

Componente	Posição do pico (2 θ)	Ângulo (θ)	Espaçamento d (nm)
NLCC	6,89	3,45	0,64
	18,99	9,5	0,46
	21,44	10,72	0,41
	23,69	11,84	0,19
	40,75	20,38	0,22
NLCA	6,85	3,43	0,64
	19,02	9,51	0,46
	21,42	10,71	0,41
	23,37	11,69	0,19
	40,48	20,24	0,22
NLCP	6,84	3,42	0,64
	19	9,5	0,46
	21,4	10,7	0,41
	23,66	11,83	0,19
	40,59	20,29	0,22
MM	6,93	3,47	0,63
	21,5	10,75	0,41
	23,81	11,91	0,37
	40,66	20,33	0,22
P188	19,18	9,59	0,23

	23,4	11,7	0,19
--	------	------	------

5.2.6 CRYO-TEM

As imagens obtidas por Cryo-TEM (Figura 18) forneceram informações detalhadas sobre a morfologia e a organização estrutural das formulações de NLCs em seu estado hidratado quase nativo. O processo de vitrificação preservou as nanopartículas sem introdução de artefatos de coloração ou desidratação, permitindo a visualização precisa de sua estrutura coloidal. A grade de suporte é claramente visível no fundo das micrografias, confirmando que o filme vitrificado apresentava espessura adequada para a transmissão de elétrons, mantendo a integridade estrutural das partículas.

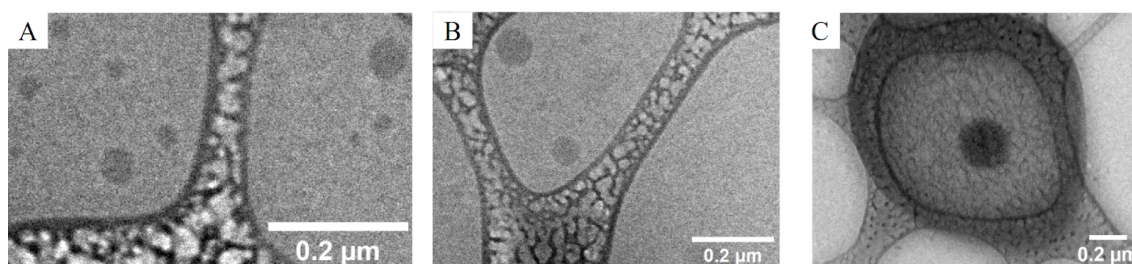


Figura 18. Micrografias Cryo-TEM das formulações de NLCs. (A) NLC C, (B) NLC A, (C) NLC P.

Na amostra NLC_C (Figura 18-A), observaram-se nanopartículas esféricas com bordas bem definidas e densidade eletrônica uniforme. O contraste interno homogêneo sugere uma matriz lipídica compacta, com organização consistente em toda a partícula. Não foram detectados sinais de deformação, fusão ou agregação, reforçando a estabilidade coloidal da formulação. c

A formulação NLC_A (Figura 18-B) apresentou morfologia igualmente esférica. A integridade dos contornos das partículas e a ausência de agregação indicam estabilização estérica eficaz. Esse comportamento corrobora evidências anteriores de que o P188 forma uma barreira interfacial que minimiza o contato partícula-partícula por repulsão estérica, garantindo estabilidade coloidal mesmo em valores baixos de potencial zeta ([Zhao & Li, 2025](#); [Mehnert & Mäder, 2012](#); [Agarwal et al., 2019](#)). Esse mecanismo de estabilização decorre da orientação estrutural do P188, em que os blocos PPO hidrofóbicos se ancoram na matriz lipídica enquanto os segmentos PEO hidrofílicos se estendem para a fase aquosa, formando uma barreira estérica protetora que reduz a atração entre partículas ([Mehnert & Mäder, 2012](#)).

Na amostra NLC_P (Figura 18-C), observou-se uma morfologia distinta, caracterizada por partículas mais escuras e com maior densidade eletrônica aparente. Esse contraste acentuado pode estar relacionado a um possível enriquecimento superficial do composto

bioativo fenólico proveniente do extrato de própolis verde. Compostos fenólicos, especialmente aqueles com estruturas aromáticas conjugadas, apresentam maior densidade eletrônica e podem contribuir para regiões de contraste mais intenso quando distribuídos na interface lipídica aquosa (Zhang et al., 2017; Veiga et al., 2017; Szliszka et al., 2013).

É importante destacar, contudo, que essa interpretação não implica a formação de uma camada superficial distinta ou a presença de uma “coroa” ao redor da nanopartícula. O Cryo-TEM revela apenas variações locais de densidade, sem permitir a identificação inequívoca de camadas químicas ou moleculares. Assim, o contraste periférico observado pode refletir uma leve redistribuição do composto bioativo durante a vitrificação ou diferenças locais na espessura do gelo, fenômenos comumente relatados em análises criogênicas de nanopartículas lipídicas (Duché et al., 2023; Ruozi et al., 2011).

A variação no contraste e na distribuição das partículas é compatível com a influência do composto bioativo sobre o empacotamento molecular da matriz lipídica, efeito já descrito em sistemas NLC contendo compostos fenólicos e terpenóides (Bodratti & Alexandridis, 2018; Ford et al., 2023).

Quanto às dimensões das partículas, os tamanhos aparentes observados por Cryo-TEM foram geralmente maiores do que os medidos por DLS, discrepância frequentemente relatada em sistemas lipídicos nanoestruturados. O DLS mede o diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão aquosa (Souza et al., 2016), enquanto o Cryo-TEM pode exibir partículas aparentemente maiores devido a variações na espessura do gelo, projeções sobrepostas ou efeitos residuais de carga (Duché et al., 2023; Ruozi et al., 2011). Essas diferenças evidenciam o caráter complementar das duas técnicas: o DLS fornece informações sobre o comportamento hidrodinâmico das partículas em suspensão, enquanto o Cryo-TEM revela detalhes morfológicos e estruturais diretos sob condições vitrificadas e quase nativas (Ruozi et al., 2011).

Em conjunto, as observações por Cryo-TEM confirmaram que todas as formulações de NLC mantiveram sua integridade e morfologia esférica após o processo de vitrificação. As imagens forneceram evidências claras de diferenças estruturais entre as formulações, reforçando o papel do surfactante e dos compostos bioativos na modulação da arquitetura interna e da estabilidade coloidal dos sistemas NLC (Zhao & Li, 2025; Mehnert & Mäder, 2012; Agarwal et al., 2019; Bodratti & Alexandridis, 2018; Ford et al., 2023; Souza et al., 2016; Duché et al., 2023; Ruozi et al., 2011).

6 CONCLUSÃO

Este estudo desenvolveu e caracterizou com sucesso carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) contendo Artepillin C (NLC_A) e extrato de própolis verde (NLC_P), utilizando uma matriz lipídica composta por miristato de miristila, ácido caprílico/cáprico e Poloxamer 188. O método de emulsão seguido de ultrassonicação mostrou-se o mais eficiente para a produção de nanopartículas estáveis, resultando em sistemas com tamanho médio inferior a 120 nm, baixo índice de polidispersidade ($PDI < 0,2$) e potenciais zeta entre -12 e -21 mV, confirmando a estabilidade coloidal a longo prazo. Ambas as formulações alcançaram 100% de eficiência de encapsulação, indicando forte afinidade entre os compostos lipofílicos e a matriz lipídica.

As análises por espectroscopia Raman, FTIR e difração de raios X (DRX) confirmaram a incorporação dos compostos bioativos no sistema lipídico sem comprometer sua ordem cristalina, sugerindo interações moleculares entre os compostos fenólicos e os componentes lipídicos. A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) demonstrou ainda altas concentrações de partículas e distribuição de tamanho uniforme, evidenciando a reprodutibilidade e homogeneidade das formulações. As imagens obtidas por Cryo-TEM confirmaram que todas as formulações de NLC mantiveram integridade estrutural e morfologia esférica.

De modo geral, os resultados indicam que os sistemas de NLC desenvolvidos são carreadores promissores para Artepillin C e extrato de própolis verde, mantendo integridade estrutural, estabilidade e alta capacidade de encapsulação. Esses achados destacam o potencial desses nanossistemas lipídicos como plataformas eficazes de liberação, com possíveis aplicações terapêuticas e cosméticas.

REFERÊNCIAS

SCHUBERT, M. A.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles - Evaluation of the method and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 55, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(02\)00130-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(02)00130-3).

DE MOURA, L. D.; RIBEIRO, L. N. M.; DE CARVALHO, F. V.; RODRIGUES DA SILVA, G. H.; FERNANDES, P. C. L.; BRUNETTO, S. Q.; RAMOS, C. D.; VELLOSO, L. A.; DE ARAÚJO, D. R.; DE PAULA, E. Docetaxel and lidocaine co-loaded (NLC-in-hydrogel) hybrid system designed for the treatment of melanoma. *Pharmaceutics*, v. 13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101552>.

GASPARI, V. P.; MARCATO, P. D.; BASTOS, J. K.; FERREIRA, I. R. S.; CORTEZ, T. F. M.; MATIAZZI, L. H.; RIBEIRO. Formulação aquosa nanoestruturada de extrato de própolis e seus usos. BR 102023002791-1, s.d.

FITRIANI, E. W.; AVANTI, C.; ROSANA, Y.; SURINI, S. Nanostructured lipid carriers: A prospective dermal drug delivery system for natural active ingredients. *Pharmacia*, v. 71, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3897/pharmacia.71.e115849>.

CHAUHAN, I.; YASIR, M.; VERMA, M.; SINGH, A. P. Nanostructured lipid carriers: A groundbreaking approach for transdermal drug delivery. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.34172/apb.2020.021>.

AKADEMIA BARU, P.; ROSLI, N. A.; HASHAM, R.; AZIZ, A. A.; AZIZ, R. Formulation and characterization of nanostructured lipid carrier encapsulated *Zingiber zerumbet* oil using ultrasonication technique. 2015.

KHAN, S.; SHARMA, A.; JAIN, V. An overview of nanostructured lipid carriers and its application in drug delivery through different routes. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 13, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.34172/apb.2023.056>.

AJIBOYE, A. L.; NANDI, U.; GALLI, M.; TRIVEDI, V. Olanzapine loaded nanostructured lipid carriers via high shear homogenization and ultrasonication. *Scientia Pharmaceutica*, v. 89, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/scipharm89020025>.

MÜLLER, R. H.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00118-7).

RODRIGUES DA SILVA, G. H.; GERONIMO, G.; RIBEIRO, L. N. M.; GUILHERME, V. A.; DE MOURA, L. D.; BOMBEIRO, A. L.; OLIVEIRA, J. D.; BREITKREITZ, M. C.; DE PAULA, E. Injectable in situ forming nanogel: A hybrid Alginate-NLC formulation extends bupivacaine anesthetic effect. *Materials Science and Engineering C*, v. 109, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110608>.

CHEN, H.; WANG, Y.; ZHAI, Y.; ZHAI, G.; WANG, Z.; LIU, J. Development of a ropivacaine-loaded nanostructured lipid carrier formulation for transdermal delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 465, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.10.046>.

METZGER, B.; SHOYKHET, K.; BUCKENMAIER, S.; STOLL, D. R. Chemistry in a Bottle: Ester Formation in Acidified Mobile-Phase Solvents. *LC-GC North America*, v. 40, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.56530/lcgc.na.ns9481m3>.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chemistry Central Journal*, v. 5, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1752-153X-5-27>.

AHMED, R. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Applications, Versatility, Efficiency, Innovation and Comparative Analysis in Modern Analytical Chemistry and in Pharmaceutical Sciences. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.20944/preprints202409.0057.v1>.

BASAK, S.; DAS, P. Reverse Phase High-performance Liquid Chromatography: A Comprehensive Review of Principles, Instrumentation, Analytical Procedures, and Pharmaceutical Applications. *Journal of Preventive Diagnostic & Treatment Strategies in Medicine*, v. 4, 2025, p. 83–92. Disponível em: https://doi.org/10.4103/jpdtsm.jpdtm_34_25.

ZISI, C.; MANGIPA, A. M.; BOUTOU, E.; PAPPALOUISI, A. Separation optimization of a mixture of ionized and non-ionized solutes under isocratic and gradient conditions in reversed-phase HPLC by means of Microsoft Excel spreadsheets. *Separations*, v. 5, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/separations5010019>.

BIRD, I. M. High performance liquid chromatography: Principles and clinical applications. *British Medical Journal*, v. 299, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.299.6702.783>.

ISRAELACHVILI, J. N. Interactions involving polar molecules. In: *Intermolecular and Surface Forces*. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-375182-9.10004-1>.

TYKODI, R. J. Identifying polar and nonpolar molecules. *Journal of Chemical Education*, v. 66, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ed066p1007>.

WIECZOREK, P. P. et al. Chemical variability and pharmacological potential of propolis as a source for the development of new pharmaceutical products. *Molecules*, v. 27, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27051600>.

SARAPA, A.; PETER, A.; BUETTNER, A.; LOOS, H. M. Organoleptic and chemical properties of propolis: a review. *European Food Research and Technology*, v. 251, 2025, p. 1331–1352. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-025-04708-y>.

KASOTE, D.; BANKOVA, V.; VILJOEN, A. M. Propolis: chemical diversity and challenges in quality control. *Phytochemical Reviews*, v. 21, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-022-09816-1>.

BALASUBRAMANIAM, A. K. et al. Propolis: A comprehensive review on nature's polyphenolic wonder. *Fitoterapia*, v. 183, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2025.106526>.

BESERRA, F. P. et al. Artepillin C as an outstanding phenolic compound of Brazilian green

propolis for disease treatment: A review on pharmacological aspects. *Phytotherapy Research*, v. 35, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.6875>.

HALLAN, S. S.; FERRARA, F.; CORTESI, R.; SGUIZZATO, M. Potential of the nano-encapsulation of antioxidant molecules in wound healing applications: an innovative strategy to enhance the bio-profile. *Molecules*, v. 30, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules30030641>.

KHAN, S. et al. Nanostructured lipid carriers: An emerging platform for improving oral bioavailability of lipophilic drugs. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, v. 5, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/2230-973X.167661>.

PAZIN, W. M. et al. The protective effect of Artepillin C against lipid oxidation on model membranes. *Journal of Molecular Liquids*, v. 324, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.115089>.

DE CARVALHO, F. V. et al. Docetaxel loaded in copaiba oil-nanostructured lipid carriers as a promising DDS for breast cancer treatment. *Molecules*, v. 27, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27248838>.

DANAIEI, M. et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, v. 10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. Hydrodynamic diameter and zeta potential of nanostructured lipid carriers: emphasizing some parameters for correct measurements. *Colloids and Surfaces A*, v. 620, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021.126610>.

MCCOMISKEY, K. P. M.; TAJBER, L. Comparison of particle size methodology and assessment of nanoparticle tracking analysis (NTA) as a tool for live monitoring of crystallisation pathways. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 130, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.07.012>.

HOLE, P. et al. Interlaboratory comparison of size measurements on nanoparticles using nanoparticle tracking analysis (NTA). *Journal of Nanoparticle Research*, v. 15, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11051-013-2101-8>.

GUILHERME, V. A. et al. Improved efficacy of naproxen-loaded NLC for temporomandibular joint administration. *Scientific Reports*, v. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47486-w>.

INVERNIZZI, C.; ROVETTA, T.; LICCHELLI, M.; MALAGODI, M. Mid and near-infrared reflection spectral database of natural organic materials in the cultural heritage field. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/7823248>.

GUPTA, S. et al. Systematic approach for the formulation and optimization of solid lipid nanoparticles of Efavirenz by high pressure homogenization using design of experiments for brain targeting and enhanced bioavailability. *Biomedical Research International*, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/5984014>.

MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D.; HOMMOSS, A.; PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.012>.

PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 366, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>.

PEZESHKI, A.; GHANBARZADEH, B.; MOHAMMADI, M.; FATHOLLAHI, I.; HAMISHEHKAR, H. Encapsulation of vitamin A palmitate in nanostructured lipid carrier (NLC) – effect of surfactant concentration on formulation properties. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, v. 4, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.5681/apb.2014.083>.

ABDULLAH, N. A. et al. Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam. *Helicon*, v. 5, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.helicon.2019.e02476>.

MURACA, G. et al. Nanostructured lipid carriers containing benzimidazole: physicochemical, biopharmaceutical and cellular in vitro studies. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3762/BJNANO.14.66>.

WEISS, J. et al. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, v. 3, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11483-008-9065-8>.

QIU, L. et al. Ursolic acid nanoparticles for oral delivery prepared by emulsion solvent evaporation method: characterization, in vitro evaluation of radical scavenging activity and bioavailability. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 47, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1573739>.

RODENAK-KLADNIEW, B. et al. Design of magnetic hybrid nanostructured lipid carriers containing 1,8-cineole as delivery systems for anticancer drugs: physicochemical and cytotoxic studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 202, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111710>.

LIU, Z. et al. Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles of baicalin for ocular drug delivery system in vitro and in vivo. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 37, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/03639045.2010.522193>.

FERREIRA, M. A. et al. Annatto oil loaded nanostructured lipid carriers: a potential new treatment for cutaneous leishmaniasis. *Pharmaceutics*, v. 13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111912>.

EMANUELE, M.; BALASUBRAMANIAM, B. Differential effects of commercial-grade and purified poloxamer 188 on renal function. *Drugs in R&D*, v. 14, 2014.

ZHAO, X.; LI, Y. Matrix Metalloproteinase-2-Responsive Peptide-Modified Cleavable PEGylated Liposomes for Paclitaxel Delivery. *Pharmaceutics*, v. 18, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph18071042>.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, 2012. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.021>.

AGARWAL, S.; MURTHY, R. S. R.; HARIKUMAR, S. L.; GARG, R. Quality by Design Approach for Development and Characterisation of Solid Lipid Nanoparticles of Quetiapine Fumarate. *Current Computer-Aided Drug Design*, v. 16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1573409915666190722122827>.

BODRATTI, A. M.; ALEXANDRIDIS, P. Formulation of poloxamers for drug delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jfb9010011>.

FORD, R. R. et al. Micelle Formation and Phase Separation of Poloxamer 188 and Preservative Molecules in Aqueous Solutions Studied by Small Angle X-ray Scattering. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 112, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.09.019>.

SOUZA, T. G. F.; CIMINELLI, V. S. T.; MOHALLEM, N. D. S. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1742-6596/733/1/012039>.

DUCHÉ, G.; HEU, C.; THORDARSON, P. Development and Characterization of Nanoscale Gel-Core Liposomes Using a Short Self-Assembled Peptide Hydrogel: Implications for Drug Delivery. *ACS Applied Nano Materials*, v. 6, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsnm.3c02172>.

RUOZI, B. et al. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. *International Journal of Nanomedicine*, v. 6, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/ijn.s14615>.

SALATINO, A. Brazilian Red Propolis: Legitimate Name of the Plant Resin Source. *MOJ Food Processing & Technology*, v. 6, 2018.

ZHANG, C.-P. et al. Artepillin C, is it a good marker for quality control of Brazilian green propolis? *Natural Product Research*, v. 31, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1303690>.

VEIGA, R. S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*, v. 122, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13407>.

SZLISZKA, E.; MERTAS, A.; CZUBA, Z. P.; KRÓL, W. Inhibition of Inflammatory Response by Artepillin C in Activated RAW264.7 Macrophages. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/735176>.

CAMURI, I. J.; DA COSTA, A. B.; ITO, A. S.; PAZIN, W. M. pH and Charge Effects Behind the Interaction of Artepillin C, the Major Component of Green Propolis, With Amphiphilic Aggregates: Optical Absorption and Fluorescence Spectroscopy Studies. *Photochemistry and Photobiology*, v. 95, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/php.13114>.

PAZIN, W. M. et al. The protective effect of Artepillin C against lipid oxidation on model membranes. *Journal of Molecular Liquids*, v. 324, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.115089>.

PAZIN, W. M. et al. Antioxidant activities of three stingless bee propolis and green propolis types. *Journal of Apicultural Research*, v. 56, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1265753>.

KUMARI, P.; LUQMAN, S.; MEENA, A. Nanomaterials: A Promising Tool for Drug Delivery. In: *Nanomaterials for Drug Delivery*. 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-29207-2_1.

YINGCHONCHAROEN, P.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacological Reviews*, v. 68, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.115.011452>.

KIM, D.-D.; CHO, H.-J.; PARK, J. W.; YOON, I.-S. Surface-modified solid lipid nanoparticles for oral delivery of docetaxel: enhanced intestinal absorption and lymphatic uptake. *International Journal of Nanomedicine*, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/IJN.S66775>.

NEVES CRUZ, J. et al. Volatile Compounds, Chemical Composition and Biological Activities of *Apis mellifera* Bee Propolis. In: *Essential Oils – Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications*. IntechOpen, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5772/intechopen.91334>.

BANKOVA, V.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. *Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin*. *Apidologie*, v. 31, n. 1, p. 3–15, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/apido:2000102>.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. *Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?* *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, n. 2, p. 253–260, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>.

MARCUCCI, M. C. *Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity*. *Apidologie*, v. 26, n. 2, p. 83–99, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/apido:19950202>.

BURDOCK, G. A. *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)*. *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00145-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00145-2).

BANKOVA, V. *Chemical diversity of propolis and the problem of standardization*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 100, n. 1–2, p. 114–117, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.004>.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, É. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. *Origin and chemical variation of Brazilian propolis*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2011, p. 1–10, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ecam/nep035>.

GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. *Identification of the constituents of propolis*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, v. 45, n. 1–2, p. 159–164, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/znc-1990-1-224>.

- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. *Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin*. Journal of Ethnopharmacology, v. 64, n. 3, p. 235–240, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00131-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00131-7).
- CASTRO, S. L.; BANKOVA, V.; DE MORAES, R. M.; SFORCIN, J. M. *Propolis: Recent advances in chemistry and therapeutic properties*. Planta Medica, v. 80, n. 8–9, p. 642–649, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0034-1382976>.
- FROZZA, C. O. S. et al. *Antitumor activity of Brazilian green propolis: induction of apoptosis and cell cycle arrest in human lung cancer cells*. Journal of Ethnopharmacology, v. 150, n. 3, p. 925–933, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013>.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. *Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 9, p. 2502–2506, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf011432b>.
- PARK, Y. K. et al. *Chemical constituents in Baccharis dracunculifolia as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 11, p. 5331–5335, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf000562u>.
- MARCUCCI, M. C. et al. *Chemical composition and botanical origin of Brazilian propolis*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, n. 5, p. 2316–2321, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf000583c>.
- MÜLLER, R. H.; MEHNERT, W. *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 50, n. 1, p. 161–177, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(00\)00087-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00087-4).
- SOUTO, E. B.; MÜLLER, R. H. *Lipid nanoparticles: Effect on bioavailability and pharmacokinetic changes*. In: WEISSIG, V. (ed.) *Drug Delivery Systems: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2010. p. 115–141.
- MÜLLER, R. H. et al. *Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products*. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 63, n. 6, p. 427–443, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.02.019>.
- TORCHILIN, V. P. *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. Nature Reviews Drug Discovery, v. 4, n. 2, p. 145–160, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd1632>.
- MÜLLER, R. H.; RUNGE, S. A.; MEHNERT, W. *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations*. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 54, n. 1, p. S131–S155, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(02\)00118-7](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00118-7).
- PARDEIKE, J.; HOMMOSS, A.; MÜLLER, R. H. *Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products*. International Journal of Pharmaceutics, v. 366, n. 1–2, p. 170–184, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.10.003>.
- WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. *The influence of solid lipid nanoparticles on skin*

hydration and viscoelasticity—In vivo study. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 53, n. 1, p. 41–47, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00192-2](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00192-2).

SHAHINazzAMAN, Md; BASAK, Bristy; EMRAN, Rashiduzzaman; ROZARIO, Patricia; OBANDA, Diana N. Artepillin C: A comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. Fitoterapia, v. 147, p. 104775, 2020. DOI: [10.1016/j.fitote.2020.104775](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104775).