

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRÓPOLIS ENCAPSULADO EM
QUITOSANA COM AÇÃO BIOCIDA PARA MODIFICAÇÃO DE FILTROS DE
AR

Jéssica Claro Pereira

São Carlos-SP
2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE PRÓPOLIS ENCAPSULADO EM
QUITOSANA COM AÇÃO BIOCIDA PARA MODIFICAÇÃO DE FILTROS DE
AR

Jéssica Claro Pereira

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Engenharia de Materiais como requisito
parcial à obtenção do título de MESTRA EM
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Orientadora: Dra. Alessandra de Almeida Lucas

Coorientadora: Dra. Mônica Lopes Aguiar

Agência Financiadora: CAPES – Processos: 88887.511896/2020-0 e
88887505019/2020-00.

São Carlos-SP
2023

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Paulo Donisete Alves Pereira e Benedita Sueli Claro Pereira, meus irmãos Renan Claro Pereira e Joice Claro Pereira, e meus avós Paulo Alves Pereira, Maria Galvão Pereira e Maria Aparecida Garcia de Godoy (*in memoriam*), pilares da minha vida.

VITAE

Bacharel em Engenharia de Materiais e Manufatura pela Universidade de São Paulo (2018).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jéssica Claro Pereira, realizada em 28/04/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Alessandra de Almeida Lucas (UFSCar)

Prof. Dr. Juliano Marini (UFSCar)

Prof. Dr. Wanderley Pereira Oliveira (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por toda sabedoria, fortaleza, consolo e por ter permitido que eu chegasse até aqui. Sem Ele, nada disso seria possível.

Agradeço aos meus pais, Paulo e Sueli, e meus irmãos Renan e Joice, por sempre me apoiarem nos meus projetos e sonhos, por sempre cuidarem de mim em todos os sentidos. Obrigada por toda a força, amor e dedicação, e por possibilitarem que esta etapa da minha vida fosse possível. Vocês são minha motivação e combustível diário.

Agradeço aos meus demais familiares e amigos da vida, por sempre torcerem e vibrarem por mim em todas as etapas da minha trajetória.

Agradeço às doutoras Rafaela André e Luiza Mercante, que com sua paixão e dedicação à pesquisa e à ciência, despertaram em mim também este sentimento. Vocês duas são para mim referências de mulheres e pesquisadoras. Obrigada por sempre me encorajarem e acreditarem em mim. Minha gratidão a vocês é eterna.

Aos amigos que ganhei durante minha trajetória no mestrado, e que espero carregar ao longo da vida: Franklin, Paulo, Matheus, Ewerton, Gustavo, Laís, Ana Beatriz, Bárbara, Eduardo, Thiago, Marcos, Felipe, Erick, Daniel, Giuliana e Wallyson.

À minha orientadora Professora Alessandra de Almeida Lucas, primeiramente por aceitar me orientar, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e trocas genuínas.

À minha coorientadora Professora Mônica Lopes Aguiar, pela coorientação, por compartilhar toda sua experiência em meios filtrantes, e pela nossa inclusão no projeto CAPES.

Aos meus colegas de laboratório Gustavo Duarte Urueña, Raul Franklin Andrade Santos e Rean Toniazzo pelas contribuições científicas, ajudas técnicas, companhia, por toda a troca e momentos de descontração.

Aos técnicos do laboratório da Polímeros, Fernando e Lourival, pelos treinamentos e suporte técnico, e ao Diego do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE-UFSCar), pela disponibilidade, ajuda e treinamento no MEV-FEG.

Ao Professor Wanderley Pereira de Oliveira, pela disponibilidade e auxílio desde o início do desenvolvimento do trabalho, esclarecimento de dúvidas sobre encapsulação e fornecimento de materiais. Sua ajuda foi essencial para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP-UFSCar), pela estrutura para a realização dos testes antimicrobianos, em especial ao Professor Clovis Wesley Oliveira de Souza, todos os ensinamentos, suporte, disponibilidade, paciência, por me encorajar e não me deixar desistir. Meu muito obrigada!

Ao Departamento de Engenharia Química (DEQ-UFSCar), pela estrutura para a realização dos testes de filtração, em especial aos alunos do Laboratório de Controle Ambiental Daniela Sanches, Karine Machry, Edilton Nunes da Silva e Paulo Augusto Marques Chagas, por todo o auxílio, dicas e ensinamentos sobre filtração de partículas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM-UFSCar) e ao Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa-UFSCar) pela infraestrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho, por meio de bolsa de estudos (Processo nº 88887.511896/2020-00). Também pelo financiamento do Projeto “Desenvolvimento de Tecidos Inteligentes para Meios Filtrantes com Caráter Biocida e Virucida”, do Programa Estratégico Emergencial de Prevenção e Combate a Surtos, Endemias, Epidemias e Pandemias (Processo nº 88887505019/2020-00).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A poluição do ar atmosférico apresenta riscos cada vez mais nocivos à saúde humana e ao meio ambiente. Atrelado a este problema já existente, a pandemia da COVID-19 trouxe uma série de novos desafios ao nosso sistema de saúde. Filtros de ar condicionado são a primeira barreira física entre os ambientes externos e internos, e, além de reter os poluentes e bioaerossóis, é importante que a proliferação dos microrganismos retidos seja inibida, a fim de evitar que estes filtros se tornem uma fonte secundária de contaminação. Visto isso, o presente trabalho teve como objetivo a síntese de nanopartículas de própolis encapsulada em quitosana, e a impregnação destas em um filtro comercial, atribuindo-lhe efeito biocida. Formulações de quitosana e própolis foram estudadas com base em parâmetros físico-químicos ideais, sendo as nanopartículas sintetizadas pelo método de gelificação ionotrópica. Propriedades físicas como tamanho de partícula, potencial zeta, eficiência de encapsulação, bem como a morfologia das partículas foram avaliadas. Duas formulações de nanopartículas foram pré-selecionadas, apresentando as melhores relações entre tamanhos (392nm e 457nm) e eficiências de encapsulação (78% e 75%), e a análise química confirmou a incorporação da própolis na matriz de quitosana. As nanopartículas apresentaram ação antimicrobiana frente à *S. aureus*, com 97% de inibição, e, ao menos nas concentrações de nanopartículas avaliadas, não apresentaram atividade frente à cepa *E. coli*. A eficiência de filtração, permeabilidade e fator de qualidade do filtro foram avaliadas antes e após a impregnação das nanopartículas, e a presença destas na sua estrutura não apresentou prejuízos em sua qualidade final. Posto isto, verificou-se que os resultados deste trabalho se mostraram promissores para a fabricação de nanopartículas de quitosana contendo própolis para posterior incorporação em matrizes funcionais, de forma sustentável, a fim de reduzir a contaminação de patógenos nos mais diversos ambientes.

Palavras-chave: Quitosana; Própolis; Nanopartículas; Atividade antimicrobiana; Meio filtrante.

ABSTRACT

OBTAINING PROPOLIS NANOPARTICLES ENCAPSULATED IN CHITOSAN WITH BIOCIDAL ACTION TO MODIFY AIR FILTERS

Atmospheric air pollution represents increasingly harmful risks to public health and the environment. Attached to this problem, the coronavirus pandemic has brought several new challenges to our health system. Air conditioner filters are the first physical barrier between the external and indoor rooms, and, in addition to retaining pollutants and bioaerosols, it is important that the proliferation of retained microorganisms is inhibited, in order to prevent these filters from becoming a secondary source of contamination. Therefore, the present work had as objectives the synthesis of chitosan-propolis nanoparticles, and their impregnation in a commercial filter, attributing it a biocidal effect. Chitosan and propolis formulations were studied based on ideal physical-chemical parameters, and the nanoparticles were synthesized by ionic gelation method. Physical properties such as particle size, zeta potential, encapsulation efficiency, FTIR spectroscopy were investigated, as well as particle morphology. Two nanoparticle formulations were pre-selected, showing the best ratios between sizes (392nm e 457nm) and encapsulation efficiencies (78% e 75%), and the chemical analysis confirmed the propolis incorporation into the chitosan matrix. The nanoparticles showed antimicrobial action against *S. aureus*, with 97% inhibition, and, at least in the concentrations of nanoparticles evaluated, they didn't show activity against the *E. coli* strain. Filtration efficiency, permeability, and filter quality factor were analyzed before and after nanoparticle's impregnation, and their presence didn't affect its final quality. Thereby, it was verified that these work results were promising for the manufacture of chitosan-propolis nanoparticles for later incorporation into functional matrices, in a sustainable way, in order to reduce the contamination of pathogens in the most diverse environments.

Keywords: Chitosan; Propolis; Nanoparticles; Antimicrobial activity; Filter media.

PUBLICAÇÕES

PEREIRA, J.C.; URUENA, G.A.D.; OLIVEIRA, W.P.; SCHNEIDER, R.; SOUZA, C.W.O.; AGUIAR, M.L.; LUCAS, A.A. Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de quitosana contendo própolis por encapsulação. In: 24 CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS. Anais do 24 CBECiMat, Águas de Lindóia – SP. Novembro, 2022.

ÍNDICE DE ASSUNTOS

	Pág.
FOLHA DE APROVAÇÃO.....	i
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
PUBLICAÇÕES.....	ix
ÍNDICE DE ASSUNTOS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Material particulado atmosférico	5
2.2 Controle de bioaerossóis em ambientes internos	6
2.2.1 Meios filtrantes.....	7
2.2.2 Filtros com atividade antimicrobiana.....	11
2.3 Nanopartículas poliméricas.....	15
2.3.1 Quitosana	16
2.3.1.1 Atividade antimicrobiana da quitosana	19
2.3.1.2 Método de Gelificação Ionotrópica	20
2.3.1.3 Nanopartículas de quitosana-TPP como material encapsulante	21
2.3.2 Própolis e seu potencial antimicrobiano.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Síntese das nanopartículas de quitosana contendo própolis	27
3.2 Impregnação das nanopartículas de quitosana contendo própolis no filtro comercial.....	30
3.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (ζ)	31
3.4 Eficiência de Encapsulação (EE%).....	31
3.4.1 Determinação da curva de calibração.....	32
3.4.2 Determinação do teor de flavonóides totais.....	34
3.4.3 Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE%).....	35

3.5	Microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG).....	35
3.6	Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR).....	36
3.7	Análises Microbiológicas.....	36
3.7.1	Método de Difusão em Disco e Método de Poços.....	37
3.7.2	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC).....	38
3.7.3	Método de Contato.....	40
3.8	Testes de Filtração.....	43
3.9	Análises Estatísticas.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	Síntese das nanopartículas de quitosana contendo própolis.....	47
4.2	Tamanho de partícula, Potencial Zeta (ζ), Eficiência de Encapsulação e Morfologia.....	48
4.2.1	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (ζ).....	48
4.2.2	Eficiência de Encapsulação (EE%).....	51
4.2.3	Microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG).....	54
4.3	Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR).....	61
4.4	Análises Microbiológicas.....	66
4.5	Testes de Filtração.....	74
5	CONCLUSÕES.....	83
6	SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
	ANEXO A.....	105
	APÊNDICE A.....	107
	APÊNDICE B.....	109
	APÊNDICE C.....	111

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Amostras das nanopartículas de quitosana com própolis encapsulado. Para a nomenclatura das amostras, foi utilizada a sigla (X:1-YP), em que (X:1) indica a razão QUI:TPP e YP a concentração (Y) de própolis (P).	29
Tabela 4.1 - Tamanhos médios das partículas, índices de polidispersividade (PDI) e potenciais zeta.	49
Tabela 4.2 - Teor de flavonóides totais para cada concentração de própolis utilizada.	51
Tabela 4.3 - Tamanhos médios de partículas e eficiências de encapsulação..	52
Tabela 4.4 - Razões mássica e molar entre quitosana e TPP, concentrações e pH das soluções de quitosana e TPP, e tamanhos de partículas resultantes imediatamente após a síntese.....	57
Tabela 4.5 - Bandas de absorção identificadas nos espectros da própolis e quitosana, e seus respectivos modos de vibrações.	65
Tabela 4.6 - Resultados do crescimento bacteriano, em UFC/mL, e o percentual de redução em relação ao controle.	73
Tabela 4.7 – Constantes de permeabilidade (k_1), eficiências de coleta (η) e fatores de qualidade (Q).....	75
Tabela 4.8 - Classificações para os meios filtrantes, segundo as normas NBR 16401-3 e ISO 16890.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 - Mecanismos de coleta. A esfera maior representa a seção transversal de uma fibra do meio filtrante, a esfera menor representa a partícula a ser coletada, e a linha contínua representa o escoamento do fluido. Adaptado de [25].	8
Figura 2.2 - Combinação dos mecanismos de coleta para obter a eficiência de filtração para vários tamanhos de partículas. Adaptado de [27].	9
Figura 2.3 - Estrutura química da quitosana, indicando suas unidades de repetição. Se m>50%, tem-se quitina; se n>50% tem-se quitosana. Adaptado de [63].	17
Figura 2.4 - Estrutura da quitosana com os grupos amino ativos, após sua protonação em condições ácidas [70].	18
Figura 2.5 - Representação das estruturas e interações presentes nas nanopartículas de quitosana-TPP. Adaptado de [81].	21
Figura 2.6 - Estrutura química dos principais tipos de flavonóides [89].	23
Figura 3.1 - Esquema do processo de síntese das nanopartículas por gelificação ionotrópica a) solubilização da quitosana em solução aquosa de ácido acético; b) adição do extrato de própolis por gotejamento na solução de quitosana; c) adição da solução de TPP por gotejamento sob agitação vigorosa para formação das nanopartículas.	27
Figura 3.2 - Imersão do filtro comercial na suspensão para impregnação das nanopartículas.	30
Figura 3.3 - (a) Formação do complexo [flavonóide - Al] ²⁺ . As cores nos tubos indicam a mudança de amarelo suave (antes da complexação) para amarelo intenso (após reação com AlCl ₃) [96]. (b) Desvio batocrômico do complexo [flavonóide - Al] ²⁺ [97].	32
Figura 3.4 - Fluxograma da metodologia para a obtenção da curva de calibração.	33
Figura 3.5 - Fluxograma da metodologia para determinação do teor de flavonóides totais.	34
Figura 3.6 - Esquema da placa de diluição em poços para determinação da MIC.	39

Figura 3.7 - Amostras dos filtros em placas de Petri, contendo uma alíquota da suspensão bacteriana, antes da incubação (amostras em triplicatas: filtros brancos, sem NPs (primeira coluna), filtros com NPs 3:1-1,5P (segunda coluna) e filtros com NPs 4:1-1,5P (terceira coluna).....	41
Figura 3.8 - Diagrama esquemático da etapa final do método de contato.	42
Figura 3.9 - Módulo experimental para os ensaios de filtração: linha SMPS. ..	43
Figura 4.1 - Aspecto visual da a) solução de quitosana e b) suspensões de nanopartículas.....	47
Figura 4.2 - Gráfico de relação entre os tamanhos médios de partículas e eficiências de encapsulação.....	53
Figura 4.3 - MEV-FEG das partículas (a) 3:1-1,5P, 10mg/ml, (b) 3:1-1,5P, 0,01mg/ml, (d) 4:1-1,5P, 10mg/ml, (e) 4:1-1,5P, 0,01mg/ml. Histogramas (c) 3:1-1,5P e (f) 4:1-1,5P.....	55
Figura 4.4 - MEV-FEG dos filtros a) branco, mag. 300x , b) branco, mag. 60000x, c) branco, mag. 120000x, d) modificado com 3:1-1,5P, mag. 300x, e) modificado com 3:1-1,5P, mag. 60000x, f) modificado com 3:1-1,5P, mag. 120000x, g) modificado com 4:1-1,5P, mag. 300, h) modificado com 4:1-1,5P, mag. 60000x, i) modificado com 4:1-1,5P, mag. 120000x.	61
Figura 4.5 - Espectros FTIR do extrato de própolis, quitosana, TPP, nanopartículas 3:1-1,5P e nanopartículas 4:1-1,5P.	62
Figura 4.6 - Placas de teste para o método de difusão (a) em disco e (b) poços.	66
Figura 4.7 - Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (MIC). a) Placa imediatamente antes da incubação. b) Placa após 24h de incubação à 37°C. 68	
Figura 4.8 - Placa de teste rápido MBC.	71
Figura 4.9 - Placas para contagem das colônias de bactérias. Ensaio realizado em triplicata, identificadas por 1, 2 e 3.	72
Figura 4.10 - Contagem logarítmica de bactérias (<i>S. aureus</i>) para o controle e as amostras estudadas. Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).	73
Figura 4.11 - Distribuição do diâmetro de partículas, geradas a partir da solução de NaCl.	75

Figura 4.12 - Queda de pressão em função da velocidade superficial do ar....	76
Figura 4.13 - Curvas de eficiência de coleta para a velocidade de filtração de 4,9 cm/s.....	78
Figura A.1 - (A) Impacto da razão molar entre NH_3^+ e O^- no tamanho e estabilidade coloidal das partículas durante 24 horas. (B-E) Esquemas representativos do monitoramento de alta frequência da estabilidade coloidal de sistemas estáveis e instáveis, representados pelas razões molares de 4.5:1 (B e D) e 1.4:1 (C e E), respectivamente.	105
Figura A.1 - Curva padrão de quercetina	107
Figura C.1 - Curva de queda de pressão sobre a espessura do filtro <i>versus</i> velocidade do fluxo de ar do filtro comercial branco.....	111
Figura C.2 - Curva de queda de pressão sobre a espessura do filtro <i>versus</i> velocidade do fluxo de ar do filtro comercial modificado com NPs 3:1-1,5P. .	111
Figura C.3 - Curva de queda de pressão sobre a espessura do filtro <i>versus</i> velocidade do fluxo de ar do filtro comercial modificado com NPs 4:1-1,5P. .	112

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Ag	Prata
AlCl₃	Cloreto de alumínio
Am 241	Americio 241
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR	Modo de reflexão atenuada
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BSE	Elétrons retroespalhados
C₀	Concentração de partículas antes da passagem pelo filtro
C_E	Concentração de partículas depois da passagem pelo filtro
C₂H₃O	Grupo acetil
COVID-19	Corona Virus Disease, 2019
CPC	<i>Condensation Particle Counter</i>
C_s	Concentração de flavonóides livres no sobrenadante
C_t	Concentração de flavonóides total
CuO	Óxido de cobre
Da	Dalton
DEQ	Departamento de Engenharia Química
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMA	<i>Diferencial Mobility Analyzer</i>
DMP	Departamento de Morfologia e Patologia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EE%	Eficiência de encapsulação
ELS	Espalhamento de luz eletroforético
EPI	Equipamento de proteção individual
EtOH	Etanol
FEG	Feixe eletrônico por emissão de campo
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de

Fourier

GD	Grau de desacetilação
GSE	Extrato de semente de toranja
HBr	Ácido bromídrico
HCl	Ácido clorídrico
HClO₄	Ácido perclórico
HEPA	<i>High Efficiency Particulate Air Filter</i>
HNO₃	Ácido nítrico
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
JIS	<i>Japanese Industrial Standard</i>
k₁	Constante de permeabilidade Darciana
k₂	Constante de permeabilidade não-Darciana
Kr 85	Kriptônio 85
L	Espessura do meio filtrante
LCE	Laboratório de Caracterização Estrutural
MBC	Concentração Mínima Bactericida
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MM	Massa molecular
MP	Material particulado atmosférico
MPPS	Most penetrating particle size
NaCl	Cloreto de Sódio
NH₂	Grupo amino
NH₃⁺	Grupo amino protonado
NO_x	Óxidos de nitrogênio
NPs	Nanopartículas
OH	Grupo hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAN	Poliacrilonitrila
PBS	Solução salina tampão fosfato
PCL	Policaprolactona
PDI	Índice de polidispersividade
PEC	Complexo polieletrólítico

PET	Polietileno tereftalato
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de acidez
PLA	Poli (ácido-lático)
PLGA	Poli (ácido lático-co-glicólico)
PM	Peso molecular
Q	Fator de qualidade
QAI	Qualidade do ar interno
QUI	Quitosana
R²	Coeficiente de correlação
RNA	Ácido ribonucleico
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SE	Elétrons secundários
SMPS	Scanning Mobility Particle Sizer
SO₂	Dióxido de enxofre
TiO₂	Dióxido de titânio
TPP	Tripolifosfato pentassódico
TSA	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade formadora de colônia
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UV-Vis	<i>Ultravioleta-visible</i>
V_s	Velocidade superficial do fluxo de ar (cm.s ⁻¹)
ZnO	Óxido de zinco
ΔP	Queda de pressão (Pa)
ζ	Potencial zeta (mV)
η_t	Eficiência de coleta total
λ	Comprimento de onda (nm)
μ	Viscosidade dinâmica do fluido (Pa.s)
ρ_g	Densidade do fluido

1 INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica possui impacto direto na saúde e no meio ambiente, e transformá-la em menos nociva tem sido cada vez mais desafiador devido à complexa composição dos poluentes. O ar poluído contém partículas de vários tamanhos, gases e microrganismos que vêm sendo associados a inúmeras doenças [1]. Bioaerossóis, contendo vírus, fungos e bactérias compõem um grupo de poluentes que promovem um aumento nos riscos à saúde pública, uma vez que se dispersam facilmente no ar podendo causar doenças crônicas e agudas, que podem ser alérgicas, infecciosas ou ainda toxigênicas [2]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a poluição do ar mata mais de sete milhões de pessoas por ano no mundo, além de causar doenças e absenteísmo no trabalho.

Atrelado a este problema, a pandemia da COVID-19, doença respiratória aguda grave causada pelo novo coronavírus, SARS-CoV2, trouxe mais uma série de desafios ao sistema de saúde, incluindo a necessidade de desenvolver meios filtrantes capazes de reter o coronavírus e outros microrganismos, prevenindo novos casos ou evitando o agravamento dos casos das pessoas já acometidas pela doença. Essa síndrome respiratória tem como forma de contágio a emissão de gotículas contaminadas expelidas pela boca através de tosse, espirro ou até mesmo conversa. Estudos mostram que o SARS-CoV2 pode permanecer ativo na forma de aerossol por até 16h em temperatura ambiente [3]. Em superfícies metálicas, plásticas e cerâmicas, o novo coronavírus pode permanecer estável por cerca de 4 dias. Já em máscaras cirúrgicas, o vírus pode permanecer ativo por 4 dias nas camadas internas, e por até 7 dias na superfície [4]. Além de equipamentos de proteção individuais (EPI's) como máscaras faciais para os profissionais da saúde e a população em geral, filtros eficientes para sistemas de ventilação, exaustão e ar condicionado de ambientes internos, como hospitais, escolas, indústrias, transportes públicos e até mesmo residências, são imprescindíveis para evitar a propagação desta e de outras doenças.

Sistemas para controlar a concentração de poluentes no ar, como os filtros, podem possuir modelos e composições diversos, de acordo com o

poluente a ser retido. Entretanto, os meios filtrantes com boa eficiência de coleta disponíveis atualmente no mercado ainda possuem custo elevado [5]. Membranas filtrantes devem permitir a passagem de ar limpo, retendo partículas finas de aerossóis. No entanto, os microrganismos retidos podem se acumular nos filtros, crescer e se propagar, tornando-se fômites, e os filtros se tornam fontes secundárias de poluentes e contaminação cruzada [6].

Diversos estudos mostram a eficiência de filtros de ar com atividades antimicrobianas, modificados com a incorporação de nanopartículas inorgânicas e extratos de plantas. Além de excelentes propriedades antimicrobianas e antivirais, os produtos naturais são considerados menos tóxicos que os agentes inorgânicos e, portanto, podem apresentar aplicações interessantes, especialmente no que tange a saúde pública [2,7].

A própolis, resina naturalmente produzida pelas abelhas, exhibe propriedades virucidas, bactericidas e fungicidas devido ao seu alto teor de flavonoides e, assim, se mostra um bom candidato para inativar bioaerossóis retidos em sistemas filtrantes [8]. Entretanto, sua aplicação prática ainda é limitada, pois apresenta alta hidrofobicidade e forte aroma. Dessa forma, a microencapsulação surge como uma boa alternativa para envolver partículas de própolis, permitindo mascarar suas propriedades sensoriais indesejáveis e evitar aglomerados de partículas, garantindo uma maior área superficial ativa, proporcionando uma maior eficácia contra os patógenos retidos nos filtros. A quitosana, polissacarídeo derivado da N-desacetilação da quitina, é considerada um interessante biopolímero natural para a produção de nano/micro cápsulas devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade e muco adesão, propiciada pelo grande número de hidroxilas e grupos amino presentes em sua cadeia polimérica [9,10].

No intuito de produzir nano e micropartículas, o método de gelificação ionotrópica se mostra uma boa alternativa, pois, além de relativamente simples, é livre de solventes orgânicos. Nesta técnica, interações eletrostáticas entre a quitosana catiônica (grupos amino) e um agente reticulante poliânion, como o tripolifosfato (TPP) resultam em complexos polieletrólíticos (PEC) [11]. As estruturas gelatinosas resultantes, geralmente apresentam formato esférico com

dimensões nanométricas, e apresentam afinidade com uma série de compostos com grupos polares ou carregados [12].

Diante desse contexto, e da motivação para melhorar a qualidade do ar interno (QAI) a partir da redução da quantidade de microrganismos ativos presentes em ambientes *indoor*, o presente trabalho buscou atribuir ação bactericida/virucida em meios filtrantes, modificando-os com micropartículas de quitosana/própolis, de forma a trazer benefícios à saúde humana, de maneira sustentável.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Material particulado atmosférico

Materiais particulados atmosféricos (MPs), também denominados aerossóis são definidos como suspensões relativamente estáveis de partículas sólidas ou líquidas (ou a mistura das fases) em um gás (ou ar) [13]. De tamanho submicrométrico (μm), os aerossóis podem ser emitidos diretamente das fontes (veículos, indústrias, queima de biomassa, erupção vulcânica, tosse, fala), como podem ser formados na atmosfera por reações químicas e processos secundários, a partir de gases como dióxido de enxofre (SO_2), óxidos de nitrogênio (NO_x) e compostos orgânicos voláteis [14].

O tamanho das partículas está diretamente associado com seu potencial de causar problemas à saúde, sendo que quanto menor, mais nocivas. Os MPs são classificados, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), por seu tamanho, considerando o diâmetro aerodinâmico médio das partículas [15]:

- $\text{MP}_{(2,5-10)}$: partículas grossas (ou inaláveis), com diâmetros entre 2,5 e $10\mu\text{m}$. Podem entrar e ficam retidas na parte superior do sistema respiratório, podendo alcançar os alvéolos pulmonares.

- $\text{MP}_{2,5}$: partículas finas (ou respiráveis), com diâmetros entre 1 e $2,5\mu\text{m}$. Podem penetrar profundamente na parte inferior do sistema respiratório, podendo atingir a corrente sanguínea.

- MP_1 : partículas ultrafinas, com diâmetros inferiores a $1\mu\text{m}$, e compreendem também os bioaerossóis.

Dentre os materiais particulados, existe a classe de poluentes denominados bioaerossóis, que correspondem às partículas suspensas no ar de origem biológica, tais como vírus, bactérias, fungos, grãos de pólen e outros materiais biológicos. Os vírus possuem tamanhos nanométricos, próximo de 100nm ; bactérias possuem aproximadamente $1\mu\text{m}$, e fungos possuem dimensões maiores que $1\mu\text{m}$ [16]. Estes microrganismos podem ser encontrados em ambientes internos e externos que, quando inalados, podem representar riscos à saúde.

2.2 Controle de bioaerossóis em ambientes internos

A poluição ambiental cresceu muito nos últimos anos, resultante do aumento da circulação de carros e crescimento de zonas industriais. A qualidade do ar como um todo é conseqüentemente afetada, impactando diretamente na saúde e qualidade de vida das pessoas [17]. Em ambientes internos, as trocas de ar são diminutas, acarretando no aumento da concentração de contaminantes biológicos nestes ambientes.

Sabe-se que a principal causa de infecções respiratórias se deve à má qualidade do ar, pela presença de aerossóis. A pandemia provocada pelo SARS-CoV-2 intensificou a preocupação com problemas respiratórios, uma vez que a doença se caracteriza por uma síndrome respiratória aguda grave. Dessa forma, o controle de contaminantes atmosféricos é muito importante para a saúde humana.

Neste contexto, o uso de filtros de ar é de grande relevância por serem uma barreira física entre ambientes limpos e contaminados, para controle de poluentes. Além dos materiais particulados, vírus, fungos, bactérias e outros microrganismos podem ser retidos por meios filtrantes, conferindo ao ambiente maior qualidade do ar [18,19].

A principal forma de controlar a qualidade do ar de ambientes internos é através do uso de sistemas de ar condicionado. Nestes sistemas, são comumente utilizados filtros mecânicos ou precipitadores eletrostáticos. Um dos principais desafios dos produtores de ar condicionado é desenvolver produtos ao mesmo tempo eficientes e econômicos, aumentando a eficiência de coleta e reduzindo o consumo energético [19].

Estudos recentes mostram a utilização de membranas de fibras com dimensões nanométricas como filtros para partículas do ar de alta eficiência (*High-Efficiency Particulate Air Filter – HEPA*), uma vez que elas proporcionam alta porosidade ao meio filtrante (>70%), são finas, apresentam maior eficiência de filtração do ar, além da possibilidade de funcionalização, conferindo ao filtro características adicionais, como por exemplo, ação biocida [20,21].

Portanto, para a retenção de partículas finas como bioaerossóis, meios filtrantes compostos por fibras em escala nanométrica apresentam grande potencial de coleta.

2.2.1 Meios filtrantes

O método de filtração envolve a separação física de um ou mais componentes de uma suspensão ou solução em um fluido (que pode ser líquido ou gás), pela sua passagem através de uma barreira permeável apenas a um ou alguns desses componentes. Essa barreira configura um meio filtrante, cuja função é reter o componente da maneira mais eficiente [22].

Estes filtros são comumente classificados de acordo com a sua estrutura, em meios porosos granulares ou fibrilares. Os meios granulares correspondem a um conjunto de partículas ou grãos (areia, carvão ativado, etc.) por onde o fluido passa. O meio fibroso é composto por fibras, sintéticas ou naturais, com tamanhos variados, podendo estar dispostas de maneira regular (tecido) ou aleatória (tecido-não-tecido). Durante a filtração por um filtro fibroso, o fluido passa por entre as fibras e as partículas suspensas são coletadas pela colisão e aderência à superfície da fibra [23]. O presente trabalho visa a utilização de um meio filtrante fibrilar, disposto aleatoriamente na forma de tecido-não-tecido.

Segundo Innocentini et al. (2009) [24], critérios fundamentais na avaliação de meios filtrantes, independente da sua estrutura ou aplicação, são eficiência de coleta, permeabilidade, fator de qualidade e resistência mecânica, tendo como variáveis principais que caracterizam a sua eficiência a espessura do meio filtrante, seu diâmetro, porosidade e queda de pressão.

Quanto ao mecanismo de filtração sólido-gás, a corrente de gás contendo o material particulado permeia o meio filtrante. A densidade do meio, a velocidade do ar, o tamanho das fibras, o tamanho das partículas de poluentes e a carga eletrostática influenciam em como o filtro remove os contaminantes. Dessa forma, a deposição das partículas sob o filtro ocorre por diferentes mecanismos de coleta, que trabalham em conjunto para reter os materiais

particulados. A Figura 2.1 indica quais são estes mecanismos e como cada um deles age na captura de partículas [25].

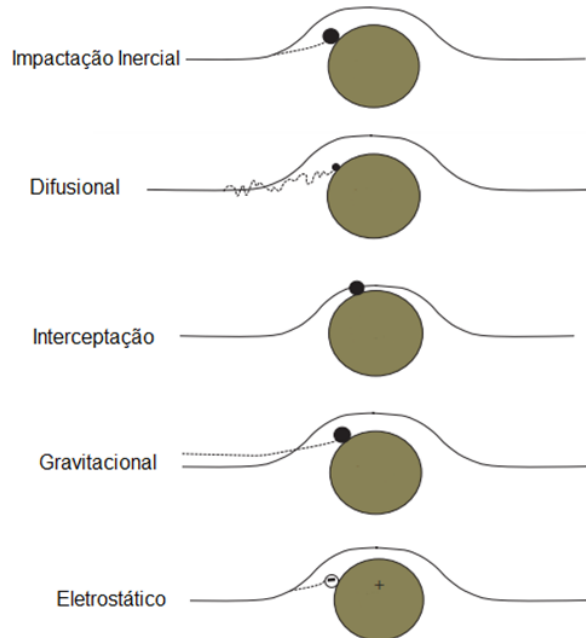


Figura 2.1 - Mecanismos de coleta. A esfera maior representa a seção transversal de uma fibra do meio filtrante, a esfera menor representa a partícula a ser coletada, e a linha contínua representa o escoamento do fluido. Adaptado de [25].

O mecanismo de impactação inercial ocorre predominantemente em partículas de maior diâmetro. A inércia das partículas faz com que elas continuem em linha reta, atingindo um objeto estacionário, enquanto que as linhas de corrente se curvam ao passar em torno dos obstáculos (fibras). Este mecanismo é mais comum quando o fluido está em velocidades mais elevadas [26,27].

O mecanismo de difusão é efetivo para partículas pequenas (menores que $0,5\mu\text{m}$). Especialmente em fluxos turbulentos, as partículas percorrem um caminho aleatório (movimento Browniano) em relação à corrente principal. Dessa forma, as chances das partículas se chocarem com o filtro aumentam significativamente. Uma vez em contato, forças de curto alcance (*Van der Waals*, eletrostática, química, etc.) são fortes o suficiente para manter as partículas no meio filtrante [26,27].

O mecanismo de interceptação ocorre quando o centro de massa da partícula está próximo à superfície do filtro, numa distância equivalente ou inferior ao seu raio. Devido ao seu tamanho finito, a partícula atinge barreira física e se deposita [26,27].

No mecanismo gravitacional. As partículas desviam da sua trajetória por meio da ação da gravidade, e acabam colidindo com a superfície do filtro. Por fim, a coleta pelo mecanismo eletrostático ocorre quando há a presença de cargas no sistema, ou devido a choques ou atritos que podem ocorrer entre as partículas [25].

A eficiência de coleta indica a capacidade do filtro em reter partículas, e uma vez que a deposição destas partículas no filtro ocorre devido aos mecanismos de coleta, a eficiência total de coleta de partículas se dá pelo somatório de todas as eficiências individuais para cada mecanismo de coleta. Assim, a eficiência de coleta depende da distribuição de tamanho das partículas presentes no fluido, tornando alguns mecanismos de coleta mais atuantes que outros. Além do tamanho da partícula, a eficiência também depende da velocidade operacional. Um filtro projetado para velocidades médias ou baixas apresentará baixa performance em ambientes cuja velocidade superficial é maior (e vice-versa) [27]. A Figura 2.2 ilustra a contribuição dos diferentes mecanismos de coleta para se obter a eficiência de coleta total.

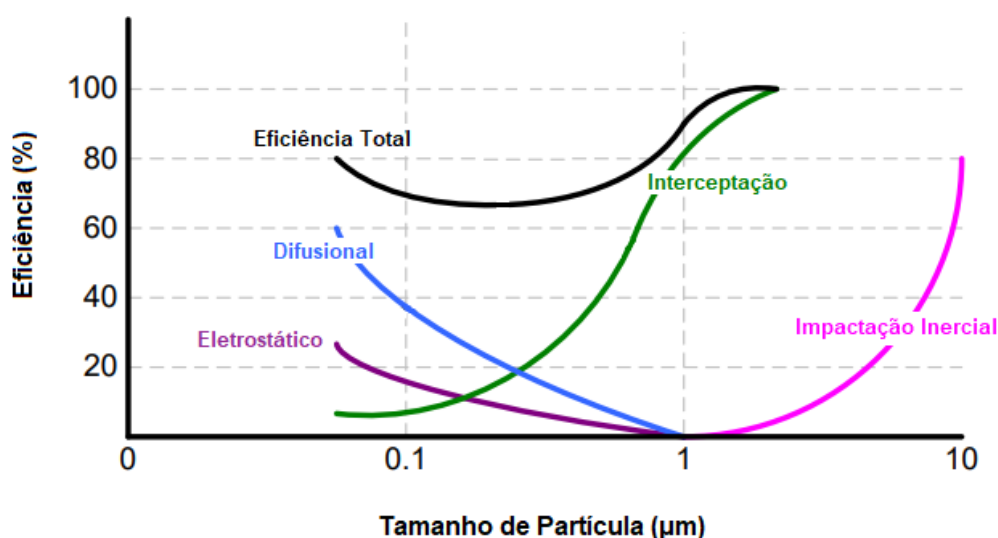


Figura 2.2 - Combinação dos mecanismos de coleta para obter a eficiência de filtração para vários tamanhos de partículas. Adaptado de [27].

A eficiência total de coleta (η_t), que inclui todos os mecanismos de coleta, pode ser calculada através da quantidade de partículas antes e depois da passagem do ar pelo filtro, conforme Equação 2.1:

$$\eta_t = \frac{C_0 - C_E}{C_0} \quad (2.1)$$

Sendo:

C_0 a concentração de partículas antes da passagem pelo meio filtrante (entrada);

C_E a concentração de partículas depois da passagem pelo meio filtrante (saída).

A permeabilidade é uma propriedade do filtro que representa a resistência encontrada pelo fluido ao atravessar o meio filtrante, e é mensurada através da queda de pressão entre o fluxo de ar e o filtro. Este parâmetro considera a completa interação entre o fluido e o meio filtrante, sendo importante na avaliação da qualidade de um filtro, uma vez que indica a maior ou menor facilidade à passagem da corrente de ar através do meio filtrante [24].

Em velocidades superficiais altas, a presença de efeitos viscosos e cinéticos podem interferir na queda de pressão. Segundo Innocentini et al. (1999) [28], a Equação de Forchheimer (1901) (Equação 2.2) é bem aceita na literatura para avaliar o escoamento de fluidos, para altas velocidades de filtração, relacionando a variação de pressão através do meio com a velocidade superficial. Através desta equação, é possível calcular teoricamente a chamada constante de permeabilidade não-Darciana, onde o primeiro termo ($\mu V_s/k_1$) refere-se aos efeitos puramente viscosos, e o segundo termo ($\rho_g V_s^2/k_2$) refere-se aos efeitos cinéticos da interação sólido-fluido.

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{\mu}{k_1} \times V_s + \frac{\rho_g}{k_2} \times V_s^2 \quad (2.2)$$

Nesta equação:

ΔP corresponde à queda de pressão (Pa);

L corresponde à espessura do meio filtrante (cm);
 μ corresponde à viscosidade dinâmica do fluido (Pa.s);
 k_1 corresponde à constante de permeabilidade Darciana do meio filtrante;
 V_s corresponde à velocidade superficial do fluxo de ar (cm.s⁻¹);
 ρ_g corresponde à densidade do fluido;
 k_2 corresponde à constante de permeabilidade não-Darciana do meio filtrante.

A Equação de Forchheimer é derivada da Equação 2.3, conhecida como Lei de Darcy, que já havia sido proposta anteriormente por Darcy em 1856, para determinar a constante de permeabilidade em baixas velocidades de escoamento do fluido, considerando, portanto, somente os efeitos do atrito sobre a queda de pressão do filtro [28].

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{\mu}{k_1} \times V_s \quad (2.3)$$

Como os filtros de aparelhos para ambientes internos, como o ar-condicionado, que constituem a base para este estudo, operam em baixas velocidades de filtração, a Lei de Darcy será utilizada para obter a constante de permeabilidade dos filtros aqui analisados.

O fator de qualidade de um filtro é um fator muito importante que analisa o desempenho dos meios filtrantes correlacionando a queda de pressão com a eficiência de remoção das partículas, especificamente para partículas de 100nm. O fator de qualidade (Q) é definido pela Equação 2.4, em que ΔP é a queda de pressão, e η a eficiência de coleta [29].

$$Q = \frac{-\ln(1-\eta)}{\Delta P} \quad (2.4)$$

2.2.2 Filtros com atividade antimicrobiana

Embora filtros de ar apresentem excelente eficiência para a retenção de patógenos, os meios filtrantes são locais propícios para crescimento e multiplicação destes microrganismos, resultando numa fonte secundária de

poluentes. Com atividade antimicrobiana, filtros de ar podem ser potencialmente utilizados para o controle da qualidade do ar interno (QAI), removendo micropartículas e inibindo a ação dos microrganismos patogênicos.

Neste sentido, a modificação de filtros com agentes biocidas pode apresentar uma solução inovadora para aplicação em sistemas de filtração de ambientes internos. De modo geral, os métodos de preparação de filtros antimicrobianos são classificados em: processamento direto, em que os agentes biocidas são combinados com o material do filtro, previamente à sua preparação; e em modificação do filtro já disponível, por meio da deposição dos agentes biocidas, por diferentes métodos, na superfície do filtro de ar.

Estudos anteriores já relatam que filtros de ar em que foram empregadas nanopartículas inorgânicas antimicrobianas são efetivos no controle de bioaerossóis. Dentre estes materiais biocidas, pode-se destacar as nanopartículas de prata (Ag), que apresentam um amplo espectro antimicrobiano. Sua ação ataca diretamente a membrana celular dos microrganismos, e como consequência de sua excepcional eficácia, tem sido amplamente estudada e aplicada, além de filtros de ar, em dispositivos médicos, eletrônicos, na manufatura de roupas e máscaras faciais, no processamento de alimentos, entre outros [7,30–32]. De forma similar, nanopartículas de cobre (Cu) [33,34], óxidos metálicos, tais como óxido de cobre [35], óxido de zinco [36], dióxido de titânio [37], nanotubos de carbono [38], são conhecidos como substâncias antimicrobianas.

No estudo de Rosa et al. (2017) [39], nanopartículas de prata foram sintetizadas por meio de redução química, e o filtro (tecido de algodão) foi impregnado pelo método de imersão. Neste método, os filtros são imersos na suspensão de nanopartículas e posteriormente secos para eliminação do solvente. Um sistema de filtração foi instalado em um banheiro da universidade, simulando uma situação real de retenção de partículas suspensas no ar. As análises microbiológicas indicaram que foi possível inibir o crescimento de 96,34% dos microrganismos retidos.

Gupta et al. (2020) [40] modificaram um pré-filtro de fibra de vidro com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) pelo método sonoquímico. A modificação

do filtro ocorreu conforme as nanopartículas eram sintetizadas pela radiação de ultrassom, ao colocarem o béquer contendo os reagentes e a amostra do filtro em um banho ultrassônico. A atividade antibacteriana do filtro decorado com nanopartículas de ZnO foi analisada frente às bactérias gram-positivas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. Para *B. subtilis*, obtiveram uma redução de ~99% das bactérias retidas pelo filtro. Já para a *S. aureus*, foi realizada uma análise qualitativa por MEV-FEG, em que foi possível observar redução significativa no crescimento bacteriano.

Machry et al. (2021) [34] impregnaram nanopartículas de cobre, sintetizadas via redução química, em um filtro de poliéster. A modificação foi realizada pelo método de aspersão (*spray coating*), através de um borrifador comercial. A suspensão de nanopartículas foi depositada por toda a superfície do filtro, o qual foi seco em estufa por 24h a 50°C. O efeito bactericida do filtro modificado foi analisado frente a bactéria *S. aureus*, atingindo uma redução no crescimento de 99,99%, e frente a bactéria *Escherichia coli*, a qual apresentou redução de 99,98%.

Apesar das indiscutíveis vantagens e inúmeras aplicações, as nanopartículas inorgânicas podem apresentar riscos à saúde, devido à sua toxicidade. Já foi reportado que nanopartículas de prata apresentam efeitos tóxicos à saúde e ao meio ambiente. A exposição crônica à prata é nociva para células e órgãos, podendo ser inalada ou ainda via penetração transcutânea [41]. Nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e nanotubos de carbono podem causar citotoxicidade, danos no DNA e estresse oxidativo [42].

Em contrapartida, têm sido propostas tecnologias alternativas com a finalidade de empregar antimicrobianos naturais em meios filtrantes para o ar. Além da alta atividade biocida, os produtos naturais são considerados menos tóxicos que os agentes inorgânicos, com efeitos ambientais brandos e baixo custo [43,44]. Nanopartículas advindas de produtos naturais apresentam múltiplos compostos e várias propriedades químicas. De acordo com o extrato e da origem do material, além dos efeitos antimicrobianos, podem apresentar atividades antibióticas, anti-inflamatórias e antivirais, ampliando ainda mais a gama de aplicações [45]. Em geral, a performance antimicrobiana de extratos de

plantas é devida à sinergia entre vários constituintes, e atribuída especialmente aos flavonóides, composto capaz de matar microrganismos pelo rompimento das funções da membrana celular e de causar danos ao DNA [44].

Muitos produtos naturais já têm sido reportados na literatura como excelentes agentes antimicrobianos, tais como o óleo de melaleuca (*tea tree oil*) [46], óleo essencial de *Sophora flavescens* [47], extrato de semente de toranja e de uva [48,49], própolis [8], sal marinho [50], óleos essenciais de capim-limão, canela, entre outros [49].

Jung et al. (2013) [51] utilizaram a espécie de planta *Sophora flavescens* para adicionar atividade antimicrobiana em filtros. As nanopartículas foram geradas e depositadas na superfície do filtro (fibras de poliuretano) pelo método de *electrospraying*, em que a atomização do líquido ocorre por forças elétricas. A eficácia antimicrobiana foi analisada frente a *Staphylococcus epidermidis*, e alcançaram a inativação de 99,99%, após avaliarem diferentes concentrações de partículas depositadas no filtro.

No estudo de Hwang et al. (2015) [45], filtros antimicrobianos foram obtidos pela impregnação de nanopartículas de *Euscaphis japonica* (pequena árvore de origem asiática), obtidas pelo método de nebulização (*aerosol deposition*), em um filtro de poliuretano. Os autores também avaliaram a eficácia antimicrobiana do filtro de acordo com a quantidade de nanopartículas depositadas, e obtiveram valores máximos de ~94% contra *Staphylococcus epidermidis*, e ~82% contra *Micrococcus luteus*.

Byun et al. (2020) [52] avaliaram a atividade antimicrobiana de filtros de ar modificados com três extratos de planta: alecrim, alho e óleo de melaleuca (*tea tree oil*). Filtros de PET (polietileno tereftalato) foram recobertos com os extratos via aspersão (*spray coating*), e o teste antimicrobiano foi realizado frente à bactéria *Micrococcus luteus*. Imediatamente após a exposição, os filtros recobertos com melaleuca induziram a redução de 40-55%, enquanto que os filtros recobertos com alecrim e alho não apresentaram nenhuma redução imediata. Entretanto, após 48h de exposição, os filtros exibiram alta atividade antimicrobiana, atingindo reduções de 99,99%, 99,0% e 99,9% para os filtros com melaleuca, alecrim e alho, respectivamente.

Salussoglia et al. (2022) [53] desenvolveram meios filtrantes de poliácridonitrila (PAN) com óleo essencial de tomilho, por duas vias: na primeira, o óleo essencial foi adicionado à solução polimérica para obter as fibras por *centrifugal spinning*, e na segunda, o óleo essencial foi impregnado nas fibras de PAN por aspersão. Como resultados, obtiveram eficiência na inativação das bactérias *E. coli* e *S. aureus* de 15,48% e 83,26%, respectivamente, para a primeira amostra, e de 88,96% e 99,97% para a segunda.

2.3 Nanopartículas poliméricas

Nanopartículas (NPs) são materiais que têm suas dimensões entre 1 e 100 nanômetros ($1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9} \text{ m}$), e podem apresentar propriedades únicas ou melhoradas, quando comparadas aos materiais em escala macroscópica, devido ao aumento em sua área superficial [54]. Apesar de as NPs serem caracterizadas pelas suas dimensões até 100nm, nanopartículas para sistemas de liberação de fármacos, por exemplo, são consideradas sistemas em nanoescala ou submicrométricos, cujas formulações podem se encontrar na faixa de 100-1000nm. Isto se justifica pelo fato destes sistemas serem compostos por, no mínimo, dois componentes: um composto ativo e uma matriz [55].

A depender do método de obtenção das nanopartículas, pode-se obter nanocápsulas ou nanoesferas, em que, no primeiro caso, o fármaco ou substância de interesse é encapsulado em uma cavidade polimérica, enquanto no segundo caso, a substância é fisicamente dispersa na matriz polimérica [55–57].

A encapsulação é um processo no qual substâncias ativas (núcleo) são retidas em uma matriz, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e/ou sob condições específicas. É amplamente utilizada na indústria alimentícia para incluir compostos bioativos em sistemas alimentares, além de proteger o composto de condições ambientais como umidade e temperatura, ampliando sua vida útil. Neste sentido, nanopartículas poliméricas podendo carregar ativos têm

ganhado grande destaque em diversas áreas, como biomédicas, farmacológicas e ambientais.

Os polímeros mais comuns utilizados para a produção de NPs são os polímeros sintéticos biodegradáveis como poli (ácido-lático) (PLA), poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), e polímeros naturais como quitosana, albumina, alginato e gelatina. Dentre os polímeros naturais, o mais utilizado para sistemas de liberação controlada é a quitosana, devido a sua propriedade de formação de blendas com uma grande variedade de polímeros, fácil modificação superficial, não-toxicidade, e boa compatibilidade com células e tecidos [55,58].

2.3.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo obtido pela desacetilação parcial da quitina, um polímero natural que constitui a maior parte dos exoesqueletos de crustáceos, insetos, e parede celular de fungos, sendo o composto orgânico mais abundante da natureza, depois da celulose. As carapaças de crustáceos são rejeitadas pela indústria pesqueira, e, portanto, seu aproveitamento reduz os impactos ambientais causados pelo acúmulo deste rejeito [59,60].

No que se refere à sua estrutura molecular, a quitosana é um copolímero semicristalino linear, constituída por unidades de N-acetil-D-glucosamina (2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose) e D-glucosamina (2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose) unidos por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ [61]. Durante o processo de desacetilação da quitina, o grupo acetil ($-C_2H_3O$) é removido da cadeia da quitina, resultando na formação do grupo amino ($-NH_2$) [62]. A Figura 2.3 apresenta a estrutura química da quitosana.

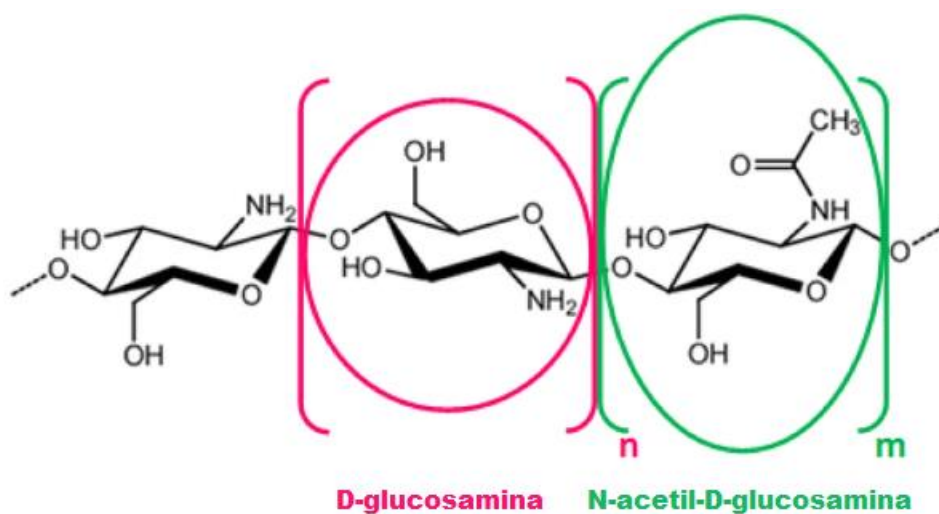


Figura 2.3 - Estrutura química da quitosana, indicando suas unidades de repetição. Se $m > 50\%$, tem-se quitina; se $n > 50\%$ tem-se quitosana. Adaptado de [63].

Propriedades como o grau de desacetilação (GD) e o peso molecular (PM) afetam fortemente propriedades físico-químicas (solubilidade, hidrofiliicidade, viscosidade, estabilidade térmica, etc) e biológicas (atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, biodegradabilidade), e conseqüentemente, sua aplicabilidade. A quantidade de cada um dos monômeros na cadeia polimérica determina o grau de desacetilação da quitosana, ou seja, o GD é dado pela razão entre os dois monômeros que compõem a molécula da quitosana (D-glucosamina e a N-acetil-D-glucosamina). A quitosana é caracterizada por conter um GD maior que 50% (se o GD é menor que 50%, temos a quitina), e esta propriedade indica o número de grupos amino (-NH₂) livres na estrutura da quitosana [62,64,65]. Com relação ao peso molecular, a quitosana é categorizada em alto peso molecular (PM > 150 kDa), baixo peso molecular (PM < 50 kDa) e médio peso molecular (PM = 50-150 kDa), tendo valores que vão de 3,8 a 2000 kDa [66].

Com relação à solubilidade, a quitosana é insolúvel em água e em grande parte dos solventes orgânicos. É uma base fraca, e os grupos amino primários da quitosana apresentam pKa aproximadamente entre 6,2 - 7,0, fazendo com que este polímero seja insolúvel em soluções neutras e alcalinas. Em soluções

ácidas, os grupos amina são protonados ($-\text{NH}_3^+$) (Figura 2.4), gerando uma repulsão entre as cadeias carregadas positivamente, que permite a difusão das moléculas de água, solubilizando o polímero. Nestas condições, a quitosana torna-se um polieletrólito catiônico solúvel em soluções diluídas de ácidos inorgânicos (HCl, HNO_3 , HBr, HClO_4) e de ácidos orgânicos (ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico) com baixos valores de pH (abaixo de seu pKa). A presença de uma alta densidade de cargas (uma carga positiva em cada unidade D-glucosamina, em C_2) e de hidroxilas (OH) distribuídas na matriz polimérica (C_3 e C_6) permite um grande número de modificações químicas, podendo interagir com diferentes moléculas, possibilitando a ocorrência de carboxilação, quartenização, fosforilação, formação de complexo eletrolítico, formação de derivados da quitosana, e, portanto, estão diretamente relacionadas às diversas propriedades e aplicações do polímero [64,65,67–69].

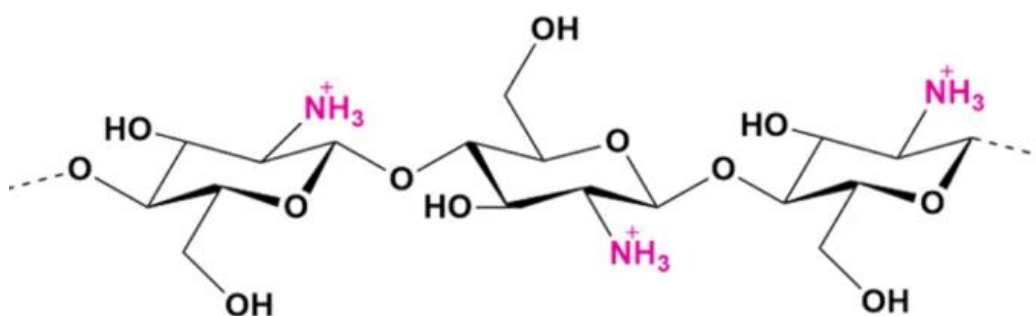


Figura 2.4 - Estrutura da quitosana com os grupos amino ativos, após sua protonação em condições ácidas [70].

A quitosana apresenta propriedades como hidrofiliabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e não-toxicidade. Devido à sua carga positiva, os grupos amino funcionalmente ativos também são responsáveis pela atividade antibacteriana e antifúngica da quitosana. Ademais, por conta da sua origem natural e múltiplas possibilidades de aplicações, tais como em filmes, blendas, recobrimentos, compósitos, sistemas de liberação de fármacos, partículas, tem atraído a atenção da comunidade científica e de indústrias [70, 71].

2.3.1.1 Atividade antimicrobiana da quitosana

Allan & Hadwiger (1979) [72] foram os primeiros a reportarem que a quitosana e seus derivados possuem efeitos antimicrobianos. Apesar do caráter antimicrobiano da quitosana e seus derivados já ter sido demonstrado em diversos estudos anteriores, o mecanismo de interação entre a quitosana e os microrganismos não é totalmente compreendido [73].

O primeiro e mais aceito mecanismo para a ação antimicrobiana da quitosana, envolve as interações eletrostáticas entre a estrutura policatiônica da quitosana e os componentes aniônicos presentes na superfície celular bacteriana. De acordo com o tipo de bactéria, as interações ocorrem de maneiras diferentes. Nas bactérias Gram-positivas, os peptidoglicanos da parede celular são hidrolisados, gerando fragmentação na estrutura da membrana, levando ao vazamento de componentes intracelulares. No caso das bactérias Gram-negativas, a quitosana pode promover alterações na permeabilidade do envelope externo, promovendo um desequilíbrio osmótico. Estas alterações prejudicam o transporte de nutrientes essenciais para o interior da célula, até a morte da célula bacteriana [68,74]. Raafat et al. (2008) [75] observaram, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, alterações estruturais nas células de *Staphylococcus simulans* 22, após contato com a quitosana carregada positivamente. Concluíram que a potencial perda de lipídeos da membrana resultou em uma sequência de eventos, levando, finalmente à morte da célula bacteriana.

Um outro possível mecanismo de ação sugere que, ao transpor a parede celular, as moléculas de quitosana (de baixo peso molecular ou nanopartículas) se ligam ao DNA do microrganismo, impedindo a síntese do RNA mensageiro (RNAm), impossibilitando, portanto, a síntese de proteínas e enzimas essenciais para a sua sobrevivência. Em contrapartida, quitosana com alto peso molecular e partículas maiores, podem formar uma camada impermeável na superfície da célula, afetando o transporte de constituintes vitais da célula bacteriana [73,74]. Liu e colaboradores [76] observaram, através de microscopia confocal, a presença de oligômeros de quitosana no interior da bactéria *Escherichia coli*. Juntamente com esta deposição da quitosana na célula, pode ocorrer a quelação

de metais e nutrientes também essenciais à sobrevivência do microrganismo [77].

Uma vez que estes mecanismos são baseados na interação eletrostática, infere-se que, quanto maior o número de aminas catiônicas, maior será a atividade antimicrobiana da quitosana [77]. Entretanto, também existem outros fatores que podem afetar a ação antimicrobiana da quitosana, tais como pH, temperatura, peso molecular, grau de desacetilação e o tipo de microrganismo [78].

2.3.1.2 Método de Gelificação Ionotrópica

Nanopartículas de quitosana podem ser produzidas por uma variedade de métodos, incluindo *electrospraying*, coacervação, nanoprecipitação, micelas reversas, *spraydrying*, gelificação ionotrópica [71]. A gelificação ionotrópica (ou gelificação iônica) foi descrita pela primeira vez por Calvo et al. (1997) [79], e se destaca por ser um processo atóxico, livre de solventes orgânicos, onde a suspensão de nanopartículas é obtida de forma rápida e branda, e apresenta boa capacidade de retenção de proteínas e fármacos, sendo muito utilizado para sistemas de liberação controlada.

Este método consiste numa reação espontânea entre polímeros carregados positivamente, por exemplo, a quitosana catiônica, e um agente reticulante polianiônico, geralmente o tripolifosfato pentassódico (TPP), formando um complexo polieletrólítico (PEC). Este complexo é estabilizado pela interação eletrostática entre os grupos NH_3^+ da quitosana com os grupos O^- do TPP, conforme demonstrado na Figura 2.5. De forma prática, a quitosana é dissolvida numa solução aquosa de ácido fraco, de forma que os grupos amina são protonados e a quitosana se torna catiônica ($\text{R-NH}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{R-NH}_3^+$). O TPP é adicionado à solução por gotejamento controlado sob agitação, e quando o complexo é formado, estruturas tridimensionais na forma de nanopartículas gelatinosas precipitam. A razão molar entre a quitosana e o TPP e as interações efetivas são cruciais para controlar o diâmetro médio e a distribuição de tamanhos das partículas [62,80].

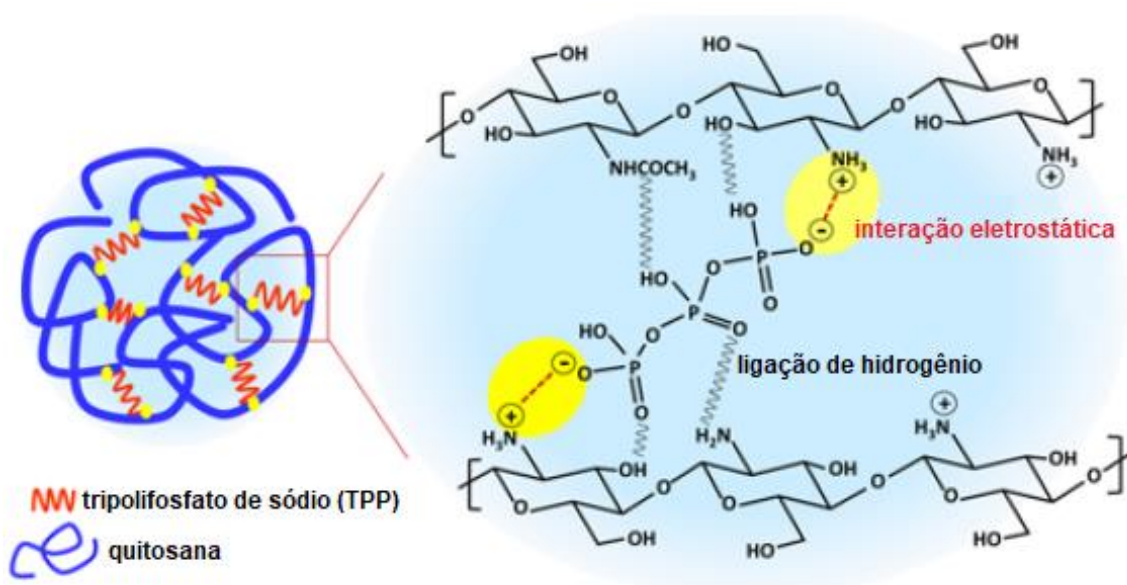


Figura 2.5 - Representação das estruturas e interações presentes nas nanopartículas de quitosana-TPP. Adaptado de [81].

2.3.1.3 Nanopartículas de quitosana-TPP como material encapsulante

Nanopartículas de quitosana obtidas por gelificação iônica têm sido relacionadas na literatura como material encapsulante a fim de carregar compostos ativos como óleos essenciais e fármacos [11].

Duse et al. (2018) [82] desenvolveram nanopartículas de quitosana carregadas com curcumina, a fim de melhorar seu efeito terapêutico contra tecidos tumorais. Caracterizações físico-químicas revelaram partículas de aproximadamente 415nm e eficiência de encapsulação de 73%, e os testes *in vitro* revelaram que as NPs foram capazes de destruir as células tumorais.

Ahmadi et al. (2018) [11] encapsularam o óleo essencial da planta *Satureja hortensis* em nanopartículas de quitosana/TPP via técnica de gelificação iônica, e investigaram seu efeito acaricida. Obtiveram uma alta eficiência de encapsulação (96%) e tamanho médio de partículas de aproximadamente 192nm. As NPs melhoraram a longevidade da atividade letal, quando comparadas com o óleo essencial puro, com uma significativa diferença na performance contra o ácaro *Tetranychus urticae*.

O objetivo do estudo de Yadav & Yadav (2021) [83] foi desenvolver um sistema de entrega (*drug delivery*) baseado em nanopartículas carregadas com proteínas/peptídeos com a finalidade de conduzir moléculas terapêuticas ao pulmão. Com este propósito, nanopartículas de quitosana foram preparadas por gelificação iônica, carregadas com a proteína BSA (*bovine serum albumin*). Os tamanhos das partículas, bem como a eficiência de encapsulação obtidos se encontram entre $193 \pm 44,97\text{nm}$ e $336 \pm 94,63\text{nm}$, e $80,73 \pm 6,37\%$ e $92,34 \pm 1,72\%$, respectivamente. Foi concluído que as nanopartículas preparadas por este método são adequadas para a aplicação proposta, sem degradação da proteína durante seu processo de fabricação.

2.3.2 Própolis e seu potencial antimicrobiano

A própolis é uma resina produzida pelas abelhas a partir de substâncias resinosas retiradas de folhas, cascas de plantas, brotos, etc., e alterada posteriormente pela adição de secreções salivares e ceras para revestimento e proteção da colmeia [84]. É um composto natural com notáveis propriedades antivirais, antifúngicas, antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes devido à sua alta concentração de flavonóides [85]. É extensivamente utilizado em produtos alimentícios e farmacêuticos, para melhora da saúde e prevenção de doenças, incluindo inflamações, diabetes, doenças cardíacas e câncer [86].

De modo geral, a própolis contém 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de ceras, 5-10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, além de pequenas quantidades de vitaminas (B1, B2, B6, C e E) e microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês [87,88].

A composição química da própolis é bastante complexa e variada, e está intimamente relacionada com a ecologia da flora de cada região de origem. Mais de 300 compostos já foram identificados na própolis, e, de modo geral, a sua composição química inclui flavonóides (como a quercetina), ácidos fenólicos (como o ácido caféico), ésteres, aldeídos fenólicos, cetonas, terpenóides e fenilpropanóides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos, entre outros compostos.

Os flavonóides são compostos polifenólicos, e sua estrutura básica é formada por um núcleo fundamental de 15 átomos de carbono arranjados em três anéis na forma C₆-C₃-C₆. Variações no estado de oxidação do anel central de pirano, resultam nas diversas classes de flavonóides. A Figura 2.6 apresenta a estrutura química das principais classes dos flavonóides [89].

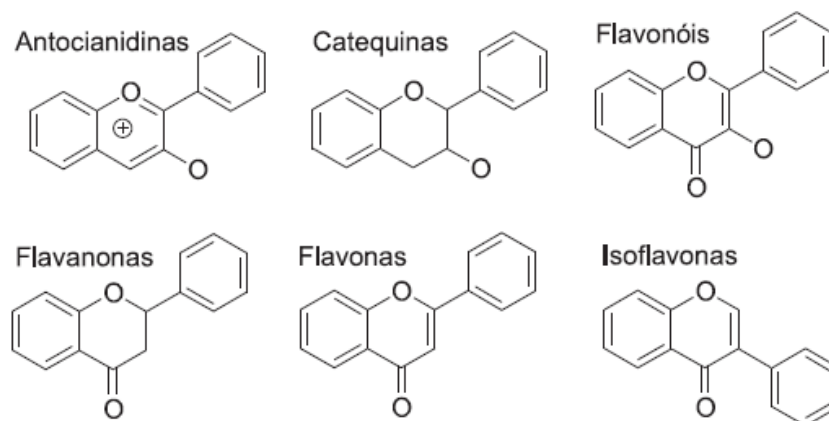


Figura 2.6 - Estrutura química dos principais tipos de flavonóides [89].

O potencial biológico da própolis se deve ao sinergismo que ocorre entre os muitos constituintes, entretanto, os compostos aromáticos, em especial os flavonóides e os ácidos fenólicos são considerados os mais ativos, e à eles que são atribuídas as propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias [8].

Os flavonóides, ácido caféico, ácido benzóico e ácido cinâmico provavelmente agem na membrana ou parede celular dos microrganismos, causando danos funcionais e estruturais. A atividade antibacteriana e antifúngica da própolis é baseada na degradação da membrana celular, que inicia com a perda de íons de potássio e posterior autólise celular. [90]. A quercetina é um flavonóide frequentemente encontrado em todos os tipos de própolis, que causa um aumento da permeabilidade da membrana, gerando perda de material celular. Nessas circunstâncias, a motilidade bacteriana é reduzida a zero, e a capacidade de transporte da membrana e a síntese de trifosfato de adenosina (ATP) são perdidas [90].

Segundo Sharaf et al. (2013) [91], os autores foram os primeiros a desenvolver um estudo destinado a construir uma base científica para a produção de tecidos de algodão com atividade antimicrobiana e outras propriedades úteis, fazendo uso da própolis como proposta de estratégia “verde”. O tecido foi modificado com uma solução aquosa de extrato de própolis, avaliando diferentes tipos de agentes reticulantes e catalisadores; o tecido foi imerso na solução de própolis, e posteriormente submetido aos rolos de um *lab padder* para melhor impregnação e eliminação do excesso de solvente. Os tecidos foram secos em 85°C, e o processo de cura se deu à 140°C. A atividade antimicrobiana dos tecidos foi avaliada frente às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* pelo método de difusão em disco, e obtiveram halos de inibição de até 20mm para *E. coli* e 27mm para *S. aureus*.

Woo et al. (2015) [86] modificaram filtros com extrato de semente de toranja (GSE) e extrato de própolis, e avaliaram sua atividade antimicrobiana, para aplicação em filtros de ar. Os extratos foram depositados nos filtros pelo método de nebulização, na forma de partículas. Bioaerossóis da bactéria *S. aureus* foi forçada através do filtro pelo mesmo método da impregnação, e a taxa de inativação foi determinada, apresentando valores similares para GSE e própolis, na faixa de 92,1-100%, 75,2-89,1% e 54,4-75,5% para números de colônias de 10^3 , 10^4 e 10^5 UFC/ml, respectivamente.

Apesar das inúmeras propriedades, a aplicação prática da própolis ainda é considerada limitada, principalmente na indústria alimentícia, devido à sua baixa solubilidade em água, forte aroma, sabor amargo, baixa solubilidade em água, e baixa estabilidade térmica [88,92]. Neste sentido, a encapsulação surge como uma potencial abordagem alternativa para proteger os compostos da própolis e mascarar suas propriedades sensoriais desagradáveis, além de melhorar sua resistência às condições ambientais, permitindo expandir suas áreas de uso.

No estudo desenvolvido por Paulo et al. (2021) [88], foram produzidas micropartículas carregadas com extrato de própolis a partir do método de dupla emulsificação e evaporação do solvente, utilizando três matrizes poliméricas diferentes: etilcelulose, PLGA e PCL. O extrato de própolis foi microencapsulado

com sucesso nas três matrizes, com $99,0 \pm 1,0\%$ de eficiência de encapsulação (baseado na presença de compostos fenólicos) para etilcelulose, $98,6 \pm 0,4\%$ para PLGA, e $98,9 \pm 0,6\%$ para PCL. Já a distribuição do tamanho de partículas foi de $4,6 \pm 0,3\mu\text{m}$, $3,4 \pm 0,4\mu\text{m}$ e $3,3 \pm 0,5\mu\text{m}$ para etilcelulose, PLGA e PCL, respectivamente.

Ong et al. (2017) [93] avaliaram formulações de nanopartículas de quitosana contendo própolis, preparadas pelo método de gelificação iônica, e avaliaram sua atividade antibacteriana em biofilmes de *Enterococcus faecalis*, bactéria associada a infecções hospitalares. Os autores obtiveram tamanhos médios de partículas entre $125,7 \pm 0,53 - 512,3 \pm 15,4\text{nm}$, e eficiências de encapsulação de 77,65% a 91,43%. Além disso, a formulação escolhida foi capaz de inibir a formação de biofilmes de *E. faecalis*, e reduziu o número de bactérias no biofilme em, aproximadamente, 90%.

Como visto, diante da possibilidade de encapsular a própolis como um composto ativo no interior de matrizes poliméricas, é possível explorar melhor suas inúmeras e eficazes propriedades. Portanto, de modo a obter benefícios à saúde pública, alinhado com a proposta de utilizar processos e materiais sustentáveis, este trabalho buscou desenvolver partículas submicrométricas de quitosana contendo própolis, por encapsulação, para futura aplicação em meios filtrantes e outras matrizes funcionais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Síntese das nanopartículas de quitosana contendo própolis

As nanopartículas de quitosana contendo própolis foram preparadas de acordo com o método de gelificação ionotrópica descrito por Calvo et al. (1997) [79] com algumas modificações, conforme o esquema da Figura 3.1.

Para a síntese das nanopartículas foram utilizados: quitosana de caranguejo comercial, com grau de desacetilação de 71%, e massa molar de 336.000 g/mol (Polymar Ciência e Nutrição S/A); ácido acético glacial, massa molar de 60,05 g/mol (Qhemis); tripolifosfato de sódio, massa molar de 367,86 g/mol (Synth); extrato alcoólico de própolis verde 17% (Apis-Brasil); álcool etílico absoluto P.A 99,8%, massa molar de 46,07 g/mol (Êxodo Científica).

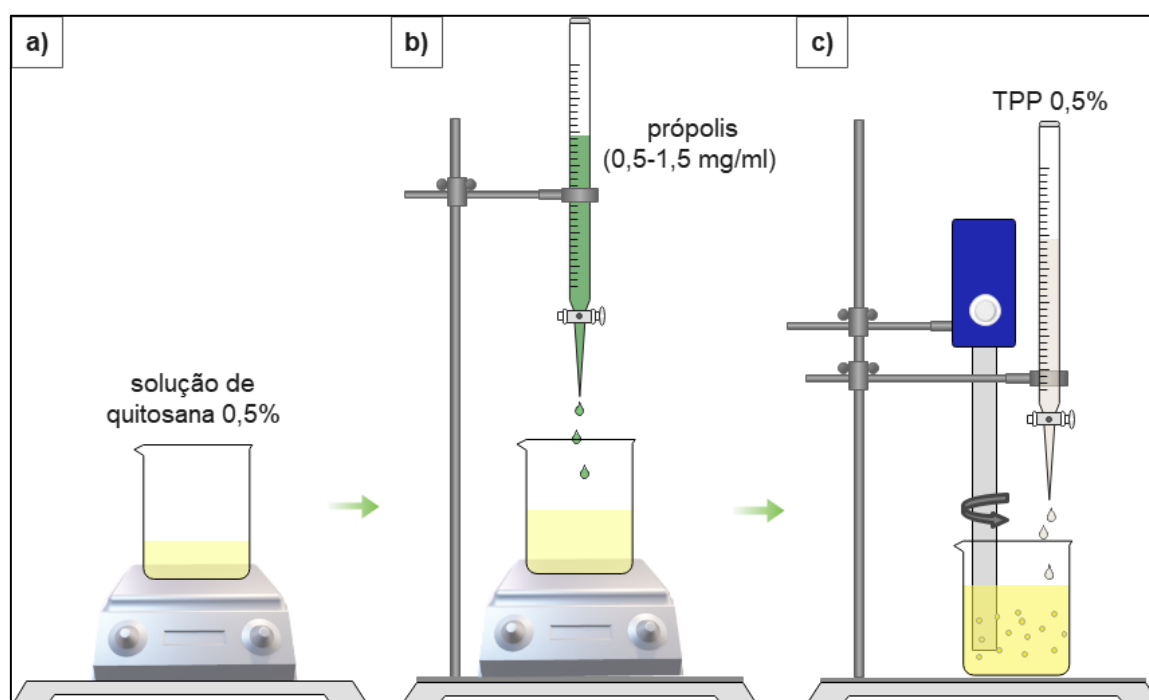


Figura 3.1 - Esquema do processo de síntese das nanopartículas por gelificação ionotrópica a) solubilização da quitosana em solução aquosa de ácido acético; b) adição do extrato de própolis por gotejamento na solução de quitosana; c) adição da solução de TPP por gotejamento sob agitação vigorosa para formação das nanopartículas.

Inicialmente, a quitosana em pó foi dissolvida em uma solução de ácido acético 1%, tendo sido mantida sob constante agitação por 24h para completa solubilização, obtendo-se uma solução de quitosana com concentração final de 0,5%. O extrato alcoólico de própolis 17% foi ajustado com etanol para concentrações de 0,5mg/ml, 1mg/ml e 1,5mg/ml, e para cada amostra, foi adicionado ao gel de quitosana por gotejamento. Esta nova solução foi mantida sob agitação por 1h. Em seguida, o tripolifosfato (TPP) foi solubilizado em água destilada, obtendo-se uma solução de concentração 0,5%.

A formação dos complexos polieletrólíticos foi realizada a partir da adição da solução de TPP 0,5% na solução de quitosana-própolis via *drop wise* (gotejamento lento e contínuo), sob agitação vigorosa, utilizando o Ultra-Turrax IKA® T18 basic, numa rotação de 7000 rpm, em temperatura ambiente. Após a adição completa do volume de TPP, a suspensão obtida foi mantida sob agitação por 30 min, e submetida a um banho de ultrassom (equipamento de banho ultrassônico Elmasonic S 60(H), 37kHz de frequência e 150W de potência efetiva) por mais 30 min.

As suspensões de partículas obtidas foram centrifugadas por 20min, a 14000 rpm. O sobrenadante foi removido, e as partículas foram ressuspendidas em água destilada. As suspensões foram armazenadas em recipientes de vidro, e submetidas ao banho de ultrassom por 15min antes de cada caracterização.

Seguindo esta metodologia, foram sintetizadas 12 amostras variando-se a concentração de própolis (0,5-1,5mg/ml) e a razão mássica entre quitosana (QUI) e TPP (2:1, 3:1, 4:1, 5:1). As amostras obtidas estão apresentadas na Tabela 3.1.

Após a síntese, a concentração de cada suspensão foi ajustada para 10mg/ml de sólidos (1% m/v). Este valor foi determinado com base em testes antimicrobianos preliminares realizados pela autora.

Tabela 3.1 - Amostras das nanopartículas de quitosana com própolis encapsulado. Para a nomenclatura das amostras, foi utilizada a sigla (X:1-YP), em que (X:1) indica a razão QUI:TPP e YP a concentração (Y) de própolis (P).

Amostra	Nomenclatura	Razão mássica QUI:TPP	Concentração Própolis [mg/ml]
1	2:1-0,5P	2:1	0,5
2	2:1-1P	2:1	1
3	2:1-1,5P	2:1	1,5
4	3:1-0,5P	3:1	0,5
5	3:1-1P	3:1	1
6	3:1-1,5P	3:1	1,5
7	4:1-0,5P	4:1	0,5
8	4:1-1P	4:1	1
9	4:1-1,5P	4:1	1,5
10	5:1-0,5P	5:1	0,5
11	5:1-1P	5:1	1
12	5:1-1,5P	5:1	1,5

Para a análise gravimétrica, 4ml de cada amostra foi pesada em placas de Petri, em triplicata. As placas foram mantidas em estufa a 40°C para completa evaporação da água presente na suspensão. Após 24h, as placas foram pesadas novamente, a fim de obter a massa seca. A concentração das amostras foi calculada através da Equação 3.1, onde C corresponde a concentração, m_{seca} corresponde à massa seca, e V corresponde ao volume da suspensão. Uma vez determinada a concentração inicial de cada suspensão, estas foram ajustadas para a concentração de interesse (10mg/ml).

$$C = \frac{m_{seca}}{V} \quad (3.1)$$

3.2 Impregnação das nanopartículas de quitosana contendo própolis no filtro comercial

Com a finalidade modificar um filtro comercial de ar para que este tenha efeito biocida, as nanopartículas de quitosana/própolis foram adicionadas ao filtro por imersão.

O meio filtrante utilizado neste estudo foi o filtro celulósico PFI 25-11, da Ahlstrom Munksjo Filtration and Performance/Louveira-SP.

O filtro foi cortado em retângulos de 12cm² e em círculos com diâmetros de 5cm, a fim de preparar amostras para os testes microbiológicos e de filtração, respectivamente.

Para a impregnação das NPs, 5ml da suspensão, de concentração 10mg/ml, foi adicionado em placas de petri, em triplicatas. As amostras de filtros foram introduzidas nas placas, e permaneceram imersas por 30min, conforme Figura 3.2. Posteriormente, as amostras foram mantidas em estufa, a 30°C, por 24h, para remoção do solvente. Uma vez secas, as amostras foram mantidas em dessecador até a realização dos testes. O volume da suspensão utilizado na etapa de imersão foi determinado pela autora a partir de testes preliminares.

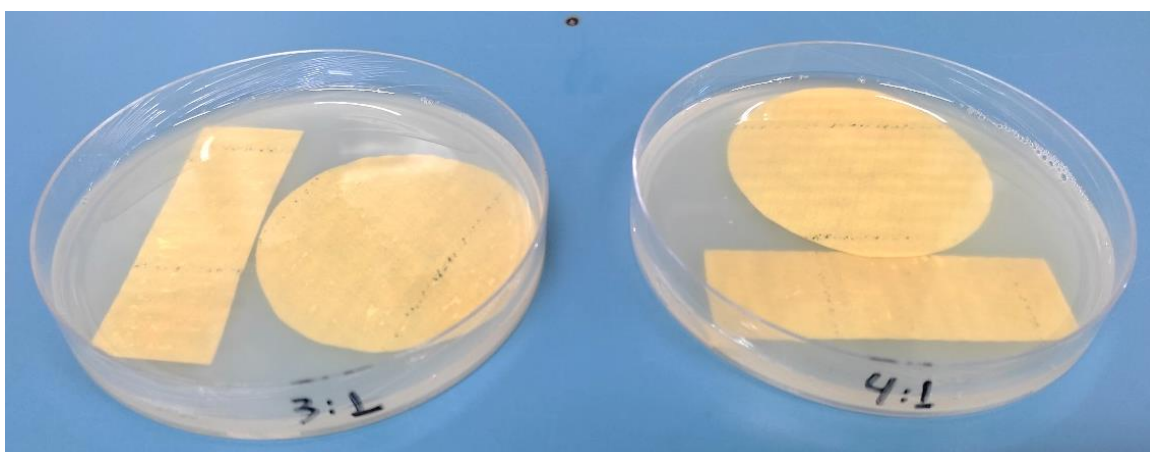


Figura 3.2 - Imersão do filtro comercial na suspensão para impregnação das nanopartículas.

3.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (ζ)

Com a finalidade de verificar os tamanhos das partículas de própolis encapsulada em quitosana, foi utilizada a técnica de caracterização Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS), a qual fornece a distribuição de tamanhos de partículas em suspensão, bem como a amplitude de dispersão destas por meio do índice de polidispersividade (PDI). Medidas do potencial zeta são um indicativo da estabilidade das partículas suspensas em um líquido, e estas foram obtidas por espalhamento de luz eletroforético (ELS).

Para a determinação dos tamanhos médios das nanopartículas, índices de polidispersividade (PDI) e potenciais ζ de cada suspensão, as amostras foram analisadas no sistema Zeta Potencial Analyzer ZetaSizer Nano ZS ZEN 36000 (Malvern Instruments), na Embrapa Instrumentação (São Carlos). Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

3.4 Eficiência de Encapsulação (EE%)

Para determinar a eficiência de encapsulação, utilizou-se o método descrito por Woisky & Salatino (1998) [94], que baseia-se na quantificação dos flavonóides totais presentes no extrato de própolis, e os flavonóides presentes nos sobrenadantes das amostras, após etapa de centrifugação. Segundo Bag et al. (2015) [95], estudos relatam que a quercetina, um dos flavonóides presentes na própolis, é uma referência adequada para quantificar flavonóides totais. A metodologia adotada já foi validada por estudos anteriores do grupo de pesquisa.

A técnica utilizada para quantificar os flavonóides é realizada por espectroscopia UV-Vis, utilizando cloreto de alumínio ($AlCl_3$). O cátion alumínio (solução $AlCl_3$ 0,5%) forma complexos estáveis com os flavonóides em etanol [flavonóide – Al]²⁺, que absorvem em comprimentos de onda bem maiores do que o flavonóide sem a presença do agente complexante. Este desvio para maiores comprimentos de onda, chamado desvio batocrômico e intensificação da absorção, faz com que a leitura em espectrofotômetro seja feita em 425nm, absorção bem superior aos complexos formados com outros componentes, como os ácidos fenólicos por exemplo, evitando interferências nas medidas. A

Figura 3.3 (a) ilustra a formação do complexo [flavonóide – Al]²⁺, enquanto a Figura 3.3 (b) mostra o desvio batocrômico [96].

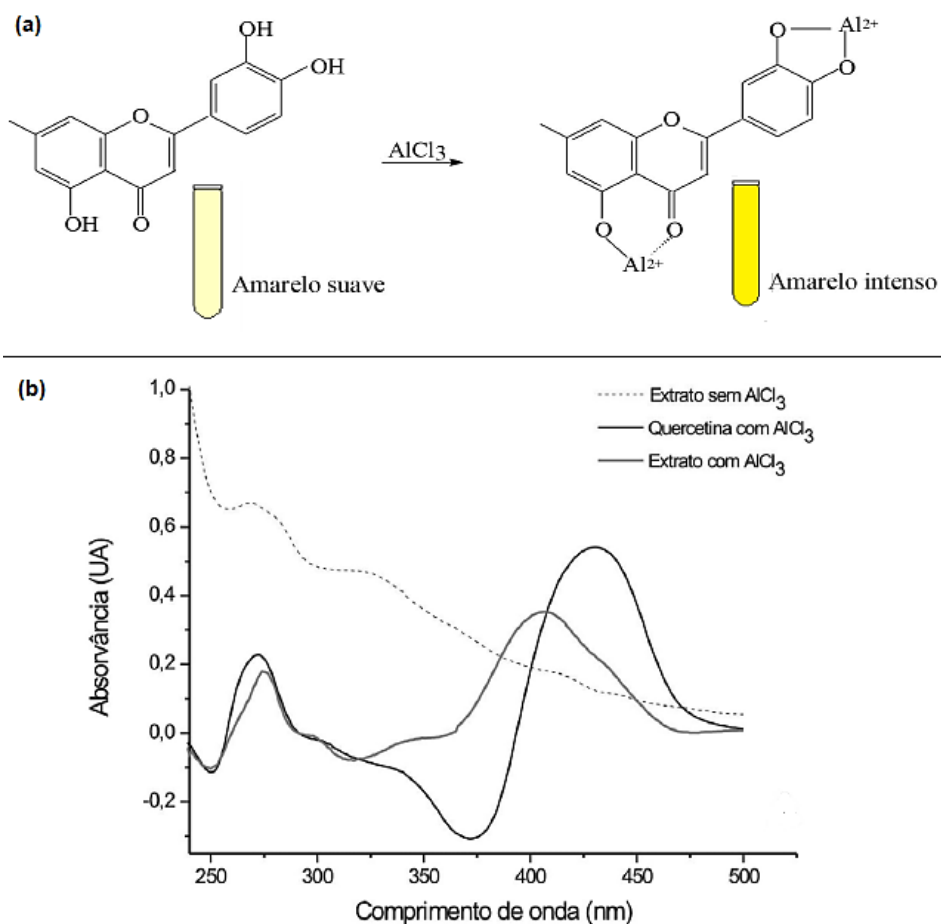


Figura 3.3 - (a) Formação do complexo [flavonóide - Al]²⁺. As cores nos tubos indicam a mudança de amarelo suave (antes da complexação) para amarelo intenso (após reação com AlCl₃) [96]. (b) Desvio batocrômico do complexo [flavonóide - Al]²⁺ [97].

3.4.1 Determinação da curva de calibração

A curva de calibração, ou curva padrão de quercetina, relaciona a absorbância das amostras com a concentração de flavonóides presente em cada uma. Para a obtenção da curva, deve-se gerar uma corrida analítica para cada uma das concentrações conhecidas. O fluxograma ilustrado na Figura 3.4 representa as etapas experimentais para a construção da curva.

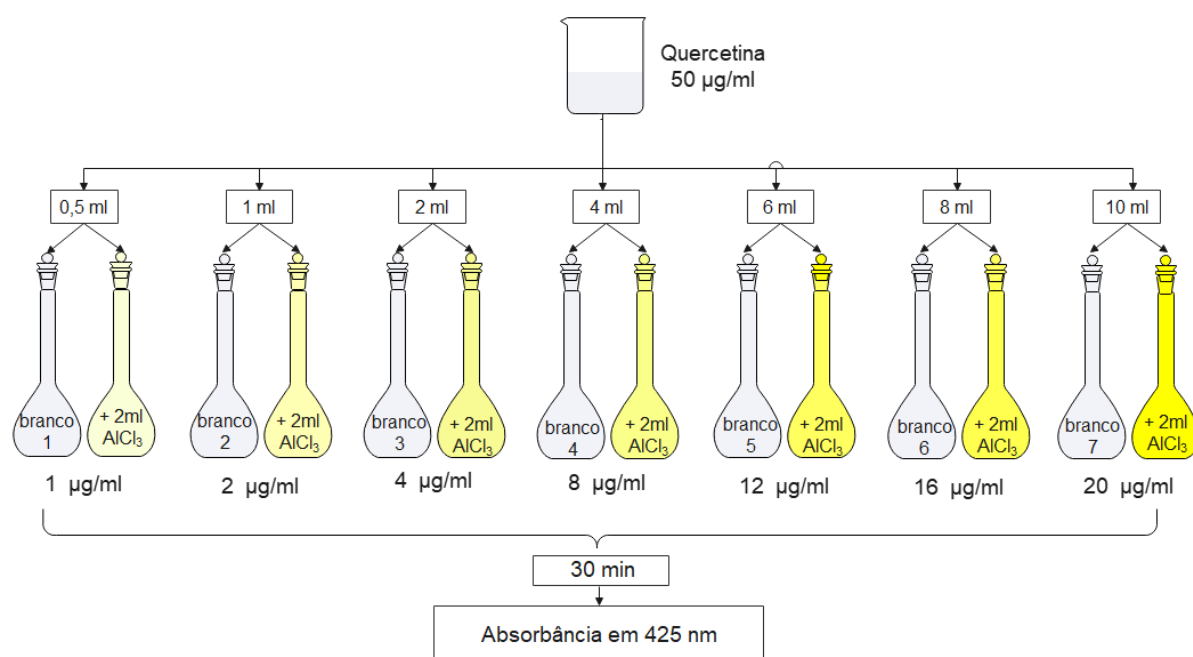


Figura 3.4 - Fluxograma da metodologia para a obtenção da curva de calibração.

Inicialmente, foi preparada uma solução padrão de quercetina (50µg/ml), dissolvendo a quercetina em etanol 40% (EtOH 40%). A partir da solução padrão, foram obtidas soluções etanólicas de quercetina (brancos), e soluções compostas pela quercetina e o agente complexante cloreto de alumínio (AlCl₃) 0,5%, nas concentrações de 1, 2, 4, 8, 12, 16 e 20µg/ml. Cada solução, preparada em balão volumétrico de 25ml, foi agitada e deixada em repouso por 30min, para completa reação, e posteriormente, foram medidas as absorvâncias, para o comprimento de onda de $\lambda=425\text{nm}$ (comprimento de onda máximo de absorção da quercetina). Todas as medidas foram realizadas em triplicatas em um espectrofotômetro UV-Vis (Varian, Cary 50 UV-Visible Spectrophotometer), no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa-UFSCar). A partir dos valores de absorvância obtidos, foi possível plotar um gráfico de concentração (µg/ml) em função dos valores de absorvância ($\lambda=425\text{nm}$). A partir da curva, foi obtida a equação da reta por regressão linear, e o coeficiente de correlação (R^2).

3.4.2 Determinação do teor de flavonóides totais

A Figura 3.5 ilustra o procedimento utilizado para a quantificação do teor de flavonóides totais no extrato de própolis, baseado na quantidade de quercetina.

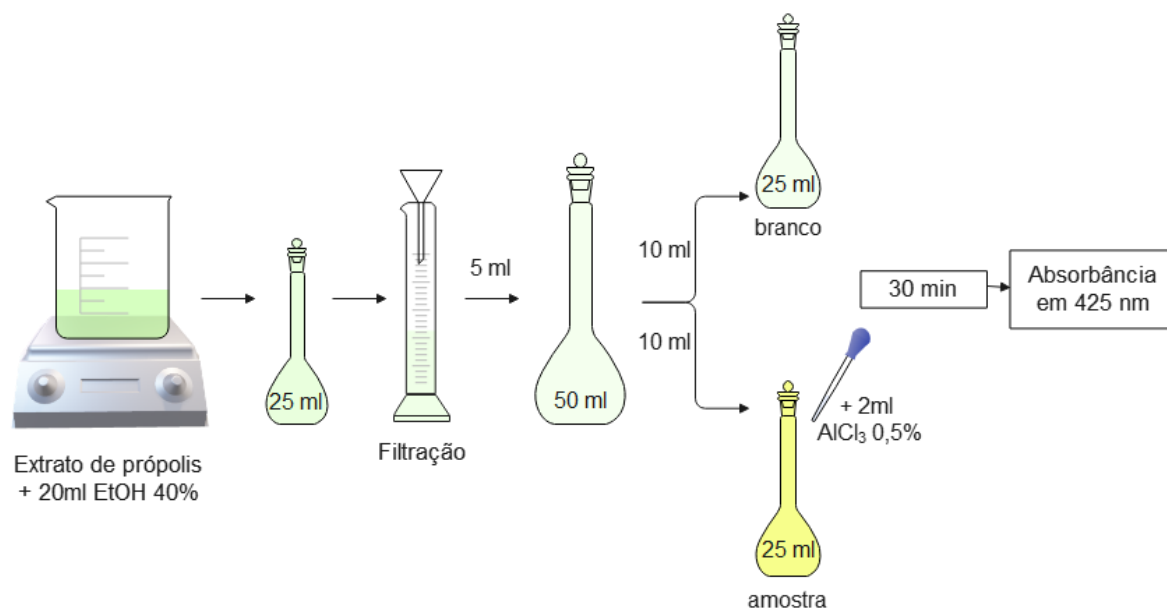


Figura 3.5 - Fluxograma da metodologia para determinação do teor de flavonóides totais.

Uma alíquota do extrato de própolis 17%, contendo 125mg de sólidos foi adicionada em um béquer com 20ml de etanol 40% (EtOH 40%) e colocada sob agitação por 15 minutos. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 25ml, cujo volume foi completado com EtOH 40%. Esta solução foi filtrada, e uma alíquota de 5ml foi transferida para um balão volumétrico de 50ml, e seu volume completado com EtOH 40%. Finalmente, duas alíquotas de 10ml foram transferidas para dois balões volumétricos de 25ml. O primeiro balão teve seu volume completado com EtOH 40% (solução branco), e ao segundo foi adicionado 2ml de solução de cloreto de alumínio a 0,5%, completando seu volume final também com a solução etanólica 40% (amostra). Após 30 minutos de repouso, a absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro UV-Vis a 425nm contra a solução branco. Este procedimento foi realizado em triplicata.

A partir da equação da reta, obtida em 3.4.1, e dos valores de absorvância obtidos, obtém-se o teor de flavonóides totais, expresso em miligrama de quercetina por grama de própolis (mg/g).

3.4.3 Determinação da Eficiência de Encapsulação (EE%)

A concentração de flavonóides livres no sobrenadante das amostras após centrifugação é um indicativo do teor de própolis que não foi encapsulada nas nanopartículas de quitosana. Esta concentração foi obtida utilizando-se a última etapa do procedimento descrito no item 3.4.2. Uma alíquota de 10ml do sobrenadante da amostra foi adicionada ao primeiro balão volumétrico de 25ml, tendo seu volume completado com EtOH 40%. No segundo balão foi adicionado 10ml do sobrenadante com 2ml de $AlCl_3$ 0,5%, e seu volume completado com EtOH 40%. Após 30 minutos, foi medida a absorvância, em $\lambda=425nm$, em espectrofotômetro UV-Vis.

Uma vez obtido o conteúdo total de flavonóides no extrato de própolis utilizado, e o conteúdo de flavonóides livres no sobrenadante, é possível estimar a quantidade de própolis incorporada nas partículas de quitosana a partir do cálculo da eficiência de encapsulação (EE%) de cada amostra, de acordo com a Equação 3.2.

$$EE\% = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100 \quad (3.2)$$

Sendo:

C_t a concentração de flavonóides total;

C_s a concentração de flavonóides livres no sobrenadante.

3.5 Microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG)

Para analisar a morfologia das partículas bem como sua distribuição nas fibras que compõem o filtro, foram feitas imagens de microscopia eletrônica de

alta resolução, em modo SE (elétrons secundários), das nanopartículas, do filtro branco comercial (branco) e dos filtros impregnados com as nanopartículas. Antes das análises, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro. Utilizou-se o microscópio eletrônico de varredura FEI Magellan 400L, no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

O tamanho médio das partículas a partir das imagens foi determinado utilizando para tanto o *software* de análise de imagens ImageJ.

3.6 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier é utilizada para determinar a estrutura de moléculas, a partir de espectros padronizados que fornecem informações estruturais [98].

Neste trabalho, a FTIR foi utilizada com a finalidade de caracterizar a estrutura molecular das amostras individuais e identificar as interações entre os constituintes das nanopartículas. A análise foi realizada em modo de reflexão total atenuada (ATR) no espectrômetro Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Fisher Scientific, na faixa de comprimento de onda de 4000 a 400 cm^{-1} , no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa – UFSCar).

3.7 Análises Microbiológicas

Com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana dos meios filtrantes modificados com as nanopartículas, foram realizados testes *in vitro* no Departamento de Morfologia e Patologia (DMP-UFSCar), sob a supervisão do Professor Doutor Clovis Wesley Oliveira de Souza.

Para as análises microbiológicas, foram utilizadas o cultivo de bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e o cultivo de bactérias gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922). Estas bactérias são comumente utilizadas em análises microbiológicas.

Para cada teste, as bactérias foram cultivadas em caldo TSB (Tryptic Soy Broth), sendo inoculadas a 37°C por 24h. A suspensão de bactérias resultante foi submetida à centrifugação de 4000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspendido em solução salina tampão fosfato (PBS), e a turbidez do inóculo foi ajustada, para a escala 0,5 McFarland, a fim de obter uma concentração de 10⁸ UFC/ml. A obtenção da concentração de acordo com a escala 0,5 foi corroborada em espectrofotômetro, por meio da medida da absorbância, que deve ser o mais próximo de 0,112, no comprimento de onda de 600nm (de acordo com a curva de calibração previamente obtida no Laboratório de Morfologia e Patologia, DMP-UFSCar).

Foram realizadas quatro análises microbiológicas: o Método de Difusão em Disco, Método de Poços, a avaliação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) e o Método de Contato, o qual partiu-se de uma concentração da ordem de 10⁶ UFC/ml. O método de contato segue a especificações da JIS Z 2801:2010 (Japanese Industrial Standard, Antibacterial products – Test for antimicrobial activity and efficacy).

3.7.1 Método de Difusão em Disco e Método de Poços

O método de difusão em disco, ou Teste de Kirk Bauer, foi reportado por Bauer et al. (1966) [99]. Neste teste, o material em análise é depositado no meio de cultura contendo a suspensão bacteriana, tendo a atividade antimicrobiana do material analisada, de forma qualitativa, pela presença (ou não) de um halo de inibição. O ágar Mueller Hinton é o meio de cultura padrão recomendado pela OMS para esta análise.

Inicialmente, preparou-se o ágar Mueller Hinton, segundo as especificações do fabricante. O pó do Mueller Hinton foi diluído em água destilada e aquecido em micro-ondas até completa solubilização. A solução foi esterilizada em autoclave, à 121°C por 15 minutos. Em seguida, foi resfriada em banho até 50°C, distribuída em placas de Petri, e após solidificação, mantida em geladeira até o uso.

As suspensões padronizadas das bactérias *S. aureus* e *E. coli* (preparadas conforme supracitado no tópico 3.7) foram espalhadas por toda a superfície do meio de cultura, com o auxílio de uma *swab* esterilizado. Em seguida, as amostras de filtros (controle e modificados com as nanopartículas) foram depositadas sobre o ágar, em contato direto com a suspensão bacteriana. As placas foram levadas à incubadora, e permaneceram por 24h à 37°C. Após o período de incubação, foi realizada análise visual para verificar a presença do halo de inibição.

No método de poços, a preparação e distribuição do ágar Mueller Hinton e do cultivo bacteriano nas placas foram realizadas da mesma forma que no método de difusão. Após distribuição dos cultivos de bactérias sobre o meio de cultura, poços de 8mm de diâmetro foram feitos no ágar com auxílio de um perfurador de metal esterilizado. Em cada poço, adicionou-se 25µl das suspensões de nanopartículas, e após 24h em incubadora a 30°C, foi verificado se houve a formação do halo de inibição.

3.7.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A concentração mínima inibitória, ou “*Minimum Inhibitory Concentration*” (MIC) indica a concentração mínima de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de determinada bactéria (efeito bacteriostático). O procedimento para a determinação da MIC envolve a diluição seriada em caldo em uma concentração definida do agente antimicrobiano em análise frente a um inóculo padronizado da cepa teste. Por outro lado, quando deseja-se determinar a Concentração Mínima Bactericida, ou “*Minimum Bactericidal Concentration*” (MBC), ou seja, a concentração mínima do agente antimicrobiano capaz de matar ou lesar irreversivelmente as bactérias, utiliza-se as subculturas das amostras da análise MIC, as quais são distribuídas em um meio de cultura, e inoculado. Se houver crescimento de colônias nas concentrações em que na MIC foram consideradas eficazes, o efeito foi apenas bacteriostático, e não bactericida. Se não houver crescimento de colônias, tem-se a MBC [100,101].

Para determinar a MIC das nanopartículas, foi utilizado o método de microdiluição em placa com 96 poços. A placa foi dividida em duas; na primeira metade duas amostras pré-selecionadas de nanopartículas agiram contra *S. aureus*, enquanto na segunda metade, as mesmas duas amostras foram analisadas frente a *E. coli*. O esquema de distribuição da placa é ilustrado na Figura 3.6.

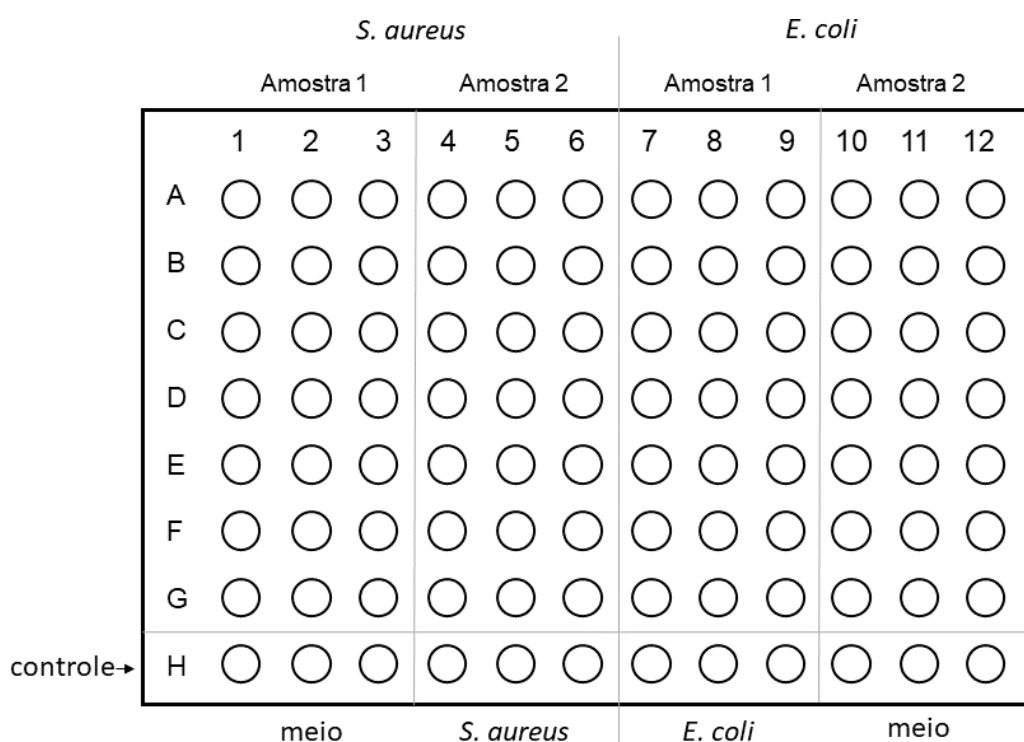


Figura 3.6 - Esquema da placa de diluição em poços para determinação da MIC.

Para o preparo da placa, alíquotas de 100µl do meio de cultura Mueller Hinton (previamente preparado conforme instruções do fabricante) foram distribuídas nos poços das fileiras A-G. Em seguida, alíquotas de 100µl de cada amostra, na concentração de 10mg/ml, foram distribuídas nos poços da fileira A. A partir da fileira A, a diluição seriada ao longo da placa foi realizada com o auxílio de uma micropipeta multicanal, com a qual o meio foi homogeneizado, e metade do volume destes poços (100µl) foram transferidos para a fileira abaixo, e assim sucessivamente, até a fileira G, na qual, após a homogeneização, metade do volume de cada poço foi descartado, garantindo a concentração

mínima analisada. Finalmente, uma alíquota das suspensões bacterianas foi adicionada em cada poço. Os testes foram realizados em triplicatas.

A fileira H foi utilizada como controle, tendo os três primeiros e os três últimos poços preenchidos somente com o meio Mueller Hinton (controle negativo), e os restantes preenchidos com alíquotas das respectivas suspensões de bactérias (controle positivo para crescimento bacteriano). Após preenchimento dos poços, a placa foi incubada a 37°C por 24h.

Após o período de incubação, foi realizado o teste colorimétrico, adicionando em cada poço 10µl de solução de resazurina 0,01%. Após um tempo para reação, foi feita a leitura visual dos resultados; a coloração azul indica inibição bacteriana, e a coloração rosa indica atividade bacteriana.

Para verificar se as concentrações em que houveram inibição também estavam agindo como bactericida, uma alíquota dos poços foi adicionada numa placa contendo ágar TSA (*Tryptic Soy Agar*), e incubada em 37°C por mais 24h. Após o período de incubação, foi feita leitura visual para verificar o crescimento ou não de colônias no meio.

3.7.3 Método de Contato

Esta metodologia é um teste quantitativo que identifica a redução bacteriana frente ao agente antimicrobiano. Neste teste, os filtros impregnados ficam em contato direto com a suspensão bacteriana, a fim de verificar a redução da concentração bacteriana. Para tanto, é realizada a uma distribuição de concentrações seriadas e logarítmicas da suspensão bacteriana no meio de cultura, após o contato com o agente antimicrobiano em análise. O crescimento das colônias de bactérias é então correlacionado com a performance bactericida do material [102].

Para este teste, a suspensão bacteriana da cepa *S. aureus* foi preparada, conforme supracitado no item 3.7, e diluída para obtenção de 10⁶ UFC/ml.

Inicialmente, preparou-se o meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSA), segundo as especificações do fabricante. O pó do TSA foi diluído em água destilada, e aquecido em micro-ondas até completa solubilização. Após

esterilização em autoclave (121°C por 15 minutos), este meio de cultura foi resfriado até 50°C, e distribuído em placas de Petri. Após resfriamento e solidificação, as placas foram mantidas em geladeira até o uso.

As amostras para este teste consistiram em filtros, com área de 4cm²; filtros brancos (controle) e filtros impregnados com NPs, todos em triplicata (Figura 3.7).

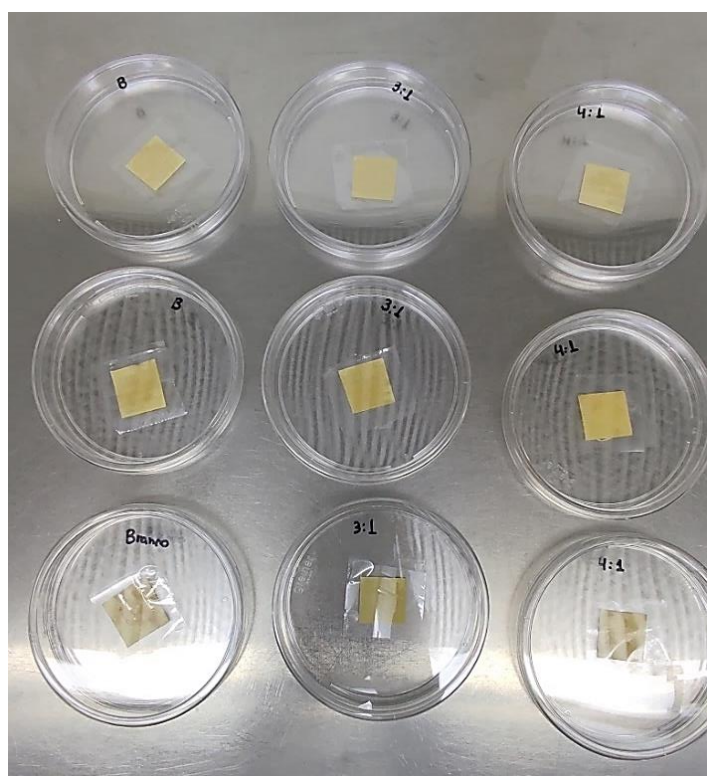


Figura 3.7 - Amostras dos filtros em placas de Petri, contendo uma alíquota da suspensão bacteriana, antes da incubação (amostras em triplicatas: filtros brancos, sem NPs (primeira coluna), filtros com NPs 3:1-1,5P (segunda coluna) e filtros com NPs 4:1-1,5P (terceira coluna).

Estes filtros foram inicialmente esterilizados em capela com fluxo laminar, com luz UV, por 15min de cada lado. Uma alíquota de 100µl da suspensão bacteriana foi adicionada em cada filtro, e, a fim de garantir que não haja nenhuma perda, um recorte plástico de 25 cm² foi colocado em cima e embaixo dos mesmos. Estes sistemas, formados, portanto, por plástico-filtro-plástico,

foram depositados em placas de Petri individualmente, que por sua vez, foram encubados em câmara úmida e mantidos na incubadora por 6h a 30°C.

Após o período de incubação, os sistemas plástico-filtro-plástico foram transferidos para tubos Falcon contendo 900µl de PBS, e submetidos à agitação, por 1 minuto, em agitador de tubos tipo vórtex (Figura 3.8). Mais duas diluições seriadas foram realizadas: 100µl da suspensão do tubo Falcon foram transferidos para um microtubo *Eppendorf* contendo 900µl de PBS, e a próxima, obtida da mesma forma. Em seguida, foi adicionado 100µl de cada suspensão (nas diferentes concentrações) nas placas contendo o ágar TSA. Cada suspensão foi espalhada com uma alça de *Drigalski*, até completa absorção. As placas foram levadas para incubadora, e mantidas a 37°C por 24h. Após este período, foi realizada a contagem das colônias formadas. O diagrama esquemático representado na Figura 3.8 ilustra a etapa final do método de contato, a partir da diluição seriada.

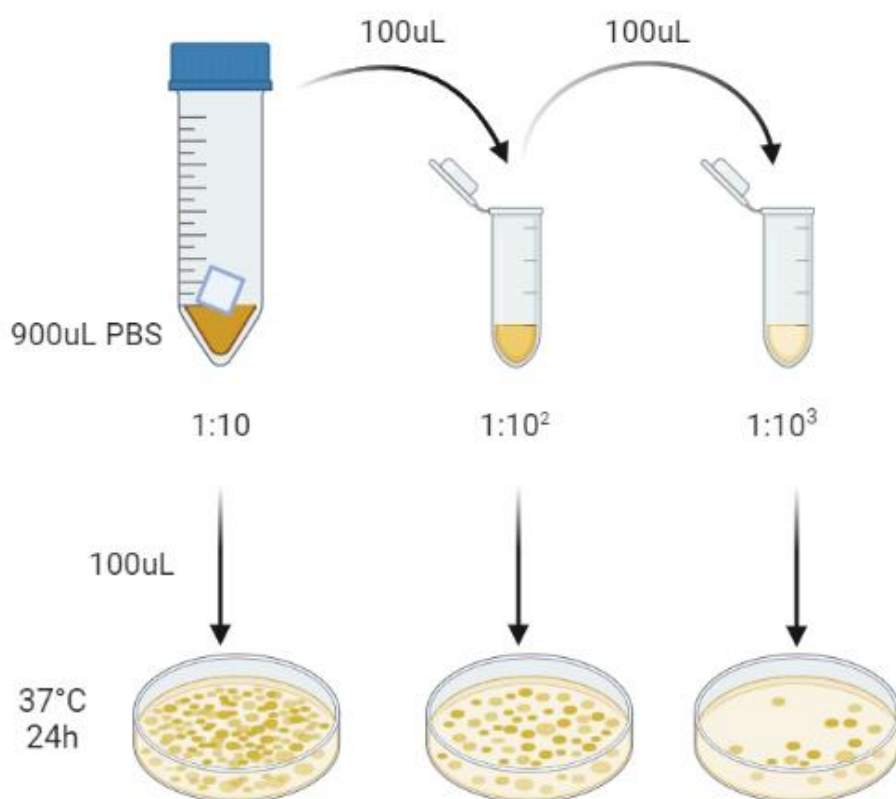


Figura 3.8 - Diagrama esquemático da etapa final do método de contato.

O cálculo para determinar a quantidade final de bactérias, a partir do número de colônias formadas, foi feito da seguinte maneira: número de colônias na placa x a grandeza recíproca da diluição da amostra = UFC/ml para aquela amostra. Já a porcentagem da redução bacteriana (R) foi calculada através da Equação 3.3, sendo C_0 a concentração bacteriana inicial (UFC/ml), e C a concentração bacterianas após incubação (UFC/ml).

$$R(\%) = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (3.3)$$

3.8 Testes de Filtração

Os testes de filtração foram realizados no Laboratório de Controle Ambiental I do Departamento de Engenharia Química (DEQ-UFSCar).

Com a finalidade de avaliar se a modificação dos meios filtrantes com as nanopartículas interferiu de alguma forma na sua qualidade da filtração, foram analisadas a eficiência de coleta e a permeabilidade dos filtros antes e depois da modificação. Para tanto, utilizou-se a unidade experimental ilustrada na Figura 3.9.



Figura 3.9 - Módulo experimental para os ensaios de filtração: linha SMPS.

O funcionamento desta linha se dá da seguinte maneira: um compressor de ar (1) fornece ar comprimido para o transporte de partículas na linha de filtração; este ar é limpo por filtros de purificação (2), que removem impurezas que possam estar contidas no ar. O gerador de partículas (3) é composto por um reservatório para armazenamento da solução. O contato entre o ar comprimido e a solução, a uma velocidade relativamente alta, produz a atomização desta solução. As gotas maiores da solução sofrem impactação inercial no bocal, e retornam ao reservatório, enquanto que a névoa de gotas menores segue na direção do escoamento de ar, e passa por um secador de difusão (4). As partículas secas alimentam a corrente de ar puro da linha principal, e se direcionam para a fonte neutralizadora de Kriptônio 85 (Kr 85) (5), utilizada para estabilizar as possíveis cargas eletrostáticas presentes nas partículas geradas. Em seguida, o ar contendo as partículas de aerossol passa pelo dispositivo de filtração (6), contendo o meio filtrante em análise, seguindo para o medidor de vazão (rotâmetro) (7). A contagem de partículas é realizada por duas sondas, uma instalada antes e outra depois do meio filtrante, ambas diretamente ligadas a uma válvula de 3 vias para acionamento manual, de acordo com a amostragem pretendida (a montante ou jusante do meio filtrante). A queda de pressão durante a filtração das partículas é medida por um manômetro digital (8). O ar contendo as partículas passa por um segundo neutralizador radioativo, de Amerício 241 (Am 241) (9) antes de seguir para o contador de partículas. O Analisador de Partículas por Mobilidade Elétrica (SMPS – *Scanning Mobility Particle Sizer*) (10) faz a contagem das partículas amostradas por faixas de diâmetros do aerossol amostrado. O sistema SMPS é composto por um Analisador de Mobilidade Diferencial (DMA – *Differential Mobility Analyzer*) (11), e um contador de partículas (CPC - *Condensation Particle Counter*) (12). Primeiramente, as partículas passam por um impactador inercial, logo na entrada do equipamento, onde partículas maiores são removidas. As partículas menores seguem para o classificador eletrostático, onde se encontra o DMA, para que sejam separadas de acordo com a mobilidade elétrica. Uma pequena porção de partículas monodispersas segue para o contador CPC. Todo este sistema é conectado a um computador (13) para aquisição dos dados.

Para medir a permeabilidade dos filtros, uma corrente de ar limpo (sem a presença de aerossóis) é forçada a passar pelo meio filtrante, e medidas da queda de pressão em função da velocidade superficial que atravessa o filtro são coletadas. Para isso, variou-se a vazão de ar, monitorada por um rotâmetro, e os respectivos valores de queda de pressão (Pa) (provocados pela presença do filtro na corrente de ar) foram medidos por meio do manômetro digital acoplado à linha. O intervalo experimental para a vazão de ar foi de 0-10 L/min, baseado nos testes anteriores realizados pelo grupo de pesquisa. A partir da curva de queda de pressão resultante, foi possível calcular o coeficiente de permeabilidade.

Para analisar a eficiência de coleta dos filtros, é realizada a contagem de partículas antes e após a passagem do fluxo de ar pelo filtro. A diferença entre as partículas na saída, com relação à entrada, refere-se à quantidade de partículas retidas no filtro. Sendo assim, para este teste, o gerador de partículas foi acionado, partindo-se de uma solução de NaCl, 0,1 g/l, e a vazão do ar manteve-se constante, em 1,5 L/min, por todo o período de análise.

A permeabilidade e eficiência de coleta dos filtros modificados são comparadas com os resultados obtidos dos filtros puros, a fim de avaliar a influência da deposição dos agentes biocidas na eficiência do meio filtrante. Portanto, os dois testes foram realizados no filtro branco e nos filtros modificados, e todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

3.9 Análises Estatísticas

Todas as medidas deste trabalho foram realizadas em triplicatas, e os valores obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão. Os resultados para tamanhos de partícula, eficiências de encapsulação e redução bacteriana (teste de contato) foram avaliados por análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias foram processadas pelo método de *Tukey* e confiança de 95% ($p < 0,05$), através do *software* Minitab®18 Statistical Software.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese das nanopartículas de quitosana contendo própolis

A suspensão coloidal de nanopartículas de quitosana e própolis foi obtida pelo método de gelificação ionotrópica, conforme descrito no item 3.1. A Figura 4.1 mostra o aspecto visual da solução de quitosana e das suspensões, para uma das concentrações de própolis (0,5mg/ml). Para as demais concentrações de própolis estudadas, o aspecto visual de suas respectivas suspensões foi semelhante aos apresentados na figura.

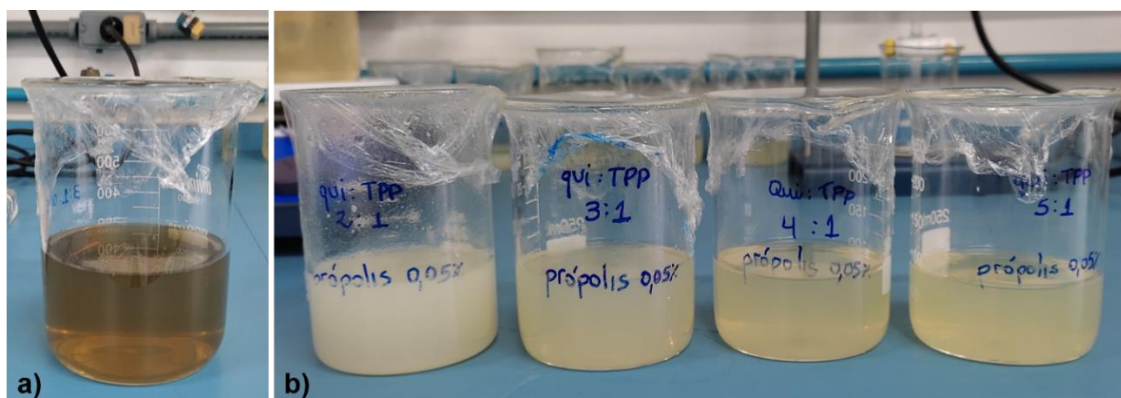


Figura 4.1 - Aspecto visual da a) solução de quitosana e b) suspensões de nanopartículas.

Sabe-se que a transparência de um meio é resultado da relação entre o tamanho das estruturas que o compõem com o comprimento de onda que o atravessa. Se as estruturas que compõem o meio apresentarem dimensões semelhantes ou maiores aos comprimentos de onda da luz incidente, maior a dispersão da luz no meio, e, portanto, menor a transparência.

Para as suspensões obtidas, observa-se que, de modo geral, quanto menor a razão entre quitosana e TPP, maior a transparência da suspensão. Infere-se, portanto, que as suspensões mais transparentes apresentam menores tamanhos de partículas, permitindo a passagem da luz visível de forma mais regular.

4.2 Tamanho de partícula, Potencial Zeta (ζ), Eficiência de Encapsulação e Morfologia

4.2.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta (ζ)

O tamanho dos sistemas nanoparticulados é um dos fatores mais significativos com relação à sua aplicabilidade. Quanto menor o tamanho das partículas, maior é a área superficial disponível para possíveis interações. No caso deste estudo, quanto menor o tamanho das partículas, menor as chances de obstrução dos poros do filtro, e maior a quantidade de sítios ativos disponíveis para agir contra os bioaerossóis.

Para avaliar as dimensões das partículas em suspensão, bem como os índices de polidispersividade (PDI), foi utilizada a técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* – DLS). Esta técnica de caracterização físico-química determina a distribuição de tamanhos de partículas em suspensão, utilizando o método de dispersão de partículas num líquido juntamente com medidas ópticas através da difração de laser. Durante a análise, é também medida a amplitude da dispersão das partículas, sendo fornecido o coeficiente adimensional Índice de Polidispersividade (PDI). Valores de PDI $\leq 0,1$ representam distribuições altamente monodispersas. Já valores superiores a 0,4 indicam uma distribuições de tamanho de partículas polidispersas [103, 104].

Medidas do potencial zeta também foram obtidas, pelo mesmo equipamento (ZetaSizer), por meio da técnica de espalhamento de luz eletroforético (ELS), que mede a velocidade da partícula em suspensão como resposta a aplicação de um campo elétrico, e a converte em potencial zeta. A determinação do potencial zeta é um bom mecanismo para determinar a estabilidade de uma suspensão, uma vez que corresponde a uma medida da magnitude da repulsão ou atração eletrostática entre as partículas suspensas em um líquido. Em módulo, conforme a magnitude do ζ aumenta, a repulsão eletrostática presente no sistema também se torna maior, indicando uma suspensão mais estável. Normalmente, esta medida varia de -100mV e +100mV, indicando a magnitude de atração ou repulsão eletrostática entre as partículas dispersas no meio. De forma geral, altos valores de potencial zeta (superiores a +30mV ou inferiores a -30mV) indicam uma suspensão estável, enquanto que

baixos valores (acima de -30mV e abaixo de +30mV) indicam instabilidade coloidal. Um potencial zeta zero, ou ponto isoelétrico da suspensão indica que a suspensão atingiu sua máxima instabilidade [105].

A Tabela 4.1 apresenta os valores médios dos tamanhos das partículas, índices de polidispersividade e potenciais zeta de cada amostra.

Tabela 4.1 - Tamanhos médios das partículas, índices de polidispersividade (PDI) e potenciais zeta.

Formulação	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)
2:1-0,5P	771,17 \pm 120,83 ^{c d}	0,58 \pm 0,11	15,93 \pm 0,15 ^f
2:1-1P	765,93 \pm 22,39 ^{c d}	0,88 \pm 0,18	12,93 \pm 0,15 ^f
2:1-1,5P	836,53 \pm 162,42 ^d	0,75 \pm 0,32	13,73 \pm 0,67 ^f
3:1-0,5P	332,75 \pm 27,22 ^a	0,34 \pm 0,07	31,7 \pm 0,98 ^{d e}
3:1-1P	587,11 \pm 31,78 ^{b c}	0,51 \pm 0,38	27,13 \pm 0,06 ^e
3:1-1,5P	392,55 \pm 15,03 ^{a b}	0,43 \pm 0,06	29,47 \pm 0,68 ^e
4:1-0,5P	484 \pm 48,69 ^{a b}	0,25 \pm 0,26	36,2 \pm 4,78 ^{b c d}
4:1-1P	552,87 \pm 16,09 ^b	0,22 \pm 0,09	38,3 \pm 0,44 ^{a b c}
4:1-1,5P	457,04 \pm 17,78 ^{a b}	0,32 \pm 0,04	41,17 \pm 2,93 ^{a b}
5:1-0,5P	496,32 \pm 39,21 ^{a b}	0,41 \pm 0,08	39,2 \pm 1,23 ^{a b c}
5:1-1P	535,3 \pm 37,28 ^b	0,37 \pm 0,08	43,97 \pm 0,76 ^a
5:1-1,5P	510,25 \pm 76,03 ^{a b}	0,24 \pm 0,12	35,4 \pm 3,11 ^{c d}

Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Inicialmente, observou-se que as amostras com razão QUI:TPP de 2:1 apresentaram os maiores tamanhos de partículas, acima de 700nm, e valores altos de PDI, entre 0,58 e 0,88, indicando certa heterogeneidade na distribuição dos tamanhos destas amostras. Somado a estes fatores, os potenciais zeta destas amostras apresentam valores baixos (<30mV), indicando instabilidade

das respectivas suspensões. Visando a aplicação em matrizes funcionais como os meios filtrantes, estas propriedades físicas não são tão interessantes. Partículas grandes, além de apresentarem uma área superficial ativa menor, podem levar a obstrução dos poros dos filtros, impossibilitando a passagem de ar, enquanto que partículas menores são preferíveis por apresentarem maior biodisponibilidade dos compostos ativos presentes nas formulações e, portanto, melhor eficácia.

Para cada uma das diferentes razões entre quitosana e TPP, variando-se a concentração de própolis de 0,5 à 1,5mg/ml de própolis, observou-se que os tamanhos das partículas não apresentaram diferenças significativas, tendo valores estatisticamente semelhantes. Com isso, a princípio, inferiu-se que o fator mandatório que define o tamanho das partículas é a interação entre a quitosana e o agente de reticulação (TPP). Neste caso, exceto para as amostras de razão QUI:TPP de 2:1, conforme esta razão diminui (ou seja, de 3:1 para 5:1), os tamanhos das partículas aumentam. Esta tendência também foi observada por Koukaras et al. (2012) [62]. Eles avaliaram diferentes razões entre quitosana e TPP para a formação de nanopartículas por gelificação iônica. A quitosana utilizada possuía GD de 75% e massa mola de 350.000g/mol, valores próximos ao da quitosana utilizada no presente trabalho (GD=71% e MM=336.000g/mol). Como resultados, obtiveram tamanhos médios de partículas semelhantes aos obtidos neste estudo, sendo as razões de 3:1 e 4:1 as que resultaram em menores tamanhos de partículas ($396 \pm 10\text{nm}$ e $342 \pm 8\text{nm}$, respectivamente).

As formulações que apresentaram menores tamanhos médios de partículas foram 3:1-0,5P ($332,75 \pm 27,22\text{nm}$), 3:1-1,5P ($392,55 \pm 15,03\text{nm}$) e 4:1-1,5P ($457,04 \pm 17,78\text{nm}$). Além disso, todas as demais formulações apresentaram valores de PDI entre 0,22 e 0,51, sugerindo que elas são monodispersas.

A estabilidade das partículas em suspensão é afetada pelo seu potencial zeta. Conforme a magnitude do potencial zeta aumenta (em módulo), maior a repulsão eletrostática entre as partículas. Nanopartículas de quitosana apresentam potencial zeta positivo devido às características catiônicas das moléculas de quitosana. Com exceção da amostra 3:1-1P, que também

apresentou um potencial zeta menor que +30mV, as demais amostras manifestaram valores entre $29,47 \pm 0,68\text{mV}$ e $43,97 \pm 0,76\text{mV}$. Novamente, observou-se que a variação da concentração de própolis não afetou os valores de potenciais zeta, uma vez que para cada uma das razões QUI:TPP, os valores em mV mostraram-se estatisticamente semelhantes entre si.

4.2.2 Eficiência de Encapsulação (EE%)

Para determinar a eficiência de encapsulação, ou seja, quantificar a porcentagem do composto ativo incorporado nas nanopartículas de quitosana, inicialmente faz-se necessário obter uma curva de calibração, que relaciona a resposta e a concentração conhecida do analito. A curva padrão de quercetina obtida está apresentada no Apêndice A, e a Equação 4.1 é a equação da reta obtida. Nessa equação, y é o valor de absorbância e x a concentração de quercetina na solução, em $\mu\text{g/ml}$.

$$y = 0,0742 x + 0,0326 \quad (4.1)$$

A partir da Equação 4.1 e dos valores de absorbância obtidos por espectroscopia UV-Vis, foi possível determinar o teor de flavonóides totais (C_t) presentes na solução etanólica de própolis utilizada em cada amostra, expresso em mg de quercetina por g de própolis. A Tabela 4.2 mostra os resultados obtidos para a determinação do teor de flavonóides totais para cada concentração de própolis: ($C_{t, 0.5}$: 0,5mg/ml, $C_{t, 1}$: 1mg/ml, $C_{t, 1.5}$: 1,5mg/ml). As medidas foram realizadas em triplicata, e os valores apresentados na Tabela 4.2 representam as médias dos resultados.

Tabela 4.2 - Teor de flavonóides totais para cada concentração de própolis utilizada.

y	x ($\mu\text{g/ml}$)	C_t (mg/g)	$C_{t, 0.5}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$C_{t, 1}$ ($\mu\text{g/ml}$)	$C_{t, 1.5}$ ($\mu\text{g/ml}$)
0,72	9,3	46,53	23,26	46,53	69,8

O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para determinar o teor de flavonóides presentes no sobrenadante (C_s) de cada uma das amostras. Por fim, a eficiência de encapsulação foi calculada, pela Equação 3.2, e os resultados estão apresentados na Tabela 4.3.

Os resultados de eficiência de encapsulação variaram entre 65,41% e 82,9%, sendo que amostras com maiores tamanhos de partículas apresentaram os maiores valores de EE%. Ong et al. (2017) [93] avaliaram a atividade antibacteriana de formulações de nanopartículas de quitosana e própolis contra biofilmes de *Enterococcus faecalis*, e obtiveram valores de eficiências de encapsulação próximos, variando entre 77% e 91%.

Tabela 4.3 - Tamanhos médios de partículas e eficiências de encapsulação.

Formulação	Tamanho médio (nm)	EE%
2:1-0,5P	771,17 ± 120,83 ^{cd}	81,21 ± 0,52 ^{ab}
2:1-1P	765,93 ± 22,39 ^{cd}	82,90 ± 0,93 ^a
2:1-1,5P	836,53 ± 162,42 ^d	79,25 ± 0,27 ^c
3:1-0,5P	332,75 ± 27,22 ^a	67,95 ± 1,24 ^f
3:1-1P	587,11 ± 31,78 ^{bc}	79,34 ± 0,16 ^{bc}
3:1-1,5P	392,55 ± 15,03 ^{ab}	78,06 ± 0,10 ^c
4:1-0,5P	484 ± 48,69 ^{ab}	71,42 ± 0,50 ^e
4:1-1P	552,87 ± 16,09 ^b	71,29 ± 0,21 ^e
4:1-1,5P	457,04 ± 17,78 ^{ab}	75,56 ± 0,18 ^d
5:1-0,5P	496,32 ± 39,21 ^{ab}	65,41 ± 0,54 ^g
5:1-1P	535,3 ± 37,28 ^b	68,76 ± 0,31 ^f
5:1-1,5P	510,25 ± 76,03 ^{ab}	71,90 ± 1,18 ^e

Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Duas formulações foram escolhidas, tendo como base uma boa relação entre as propriedades físico-químicas avaliadas até aqui, tais como tamanho de partícula, PDI, potencial zeta e eficiência de encapsulação. A Figura 4.2 mostra um gráfico que correlaciona o tamanho médio de partículas das amostras com seus respectivos valores de EE%.

Nota-se na Figura 4.2 que, as formulações que apresentaram uma melhor relação entre tamanho e eficiência são as 3:1-1,5P e 4:1-1,5P, ou seja, exibiram tamanhos médios de partículas baixos enquanto que os valores de EE% foram altos. Além disso, estas amostras apresentaram baixos valores de PDI (0,43 e 0,32 respectivamente) e valores de potenciais zeta iguais ou maiores que +30 mV ($29,47 \pm 0,68\text{mV}$ e $41,17 \pm 2,93\text{mV}$ respectivamente), como já apresentado na Tabela 4.1.

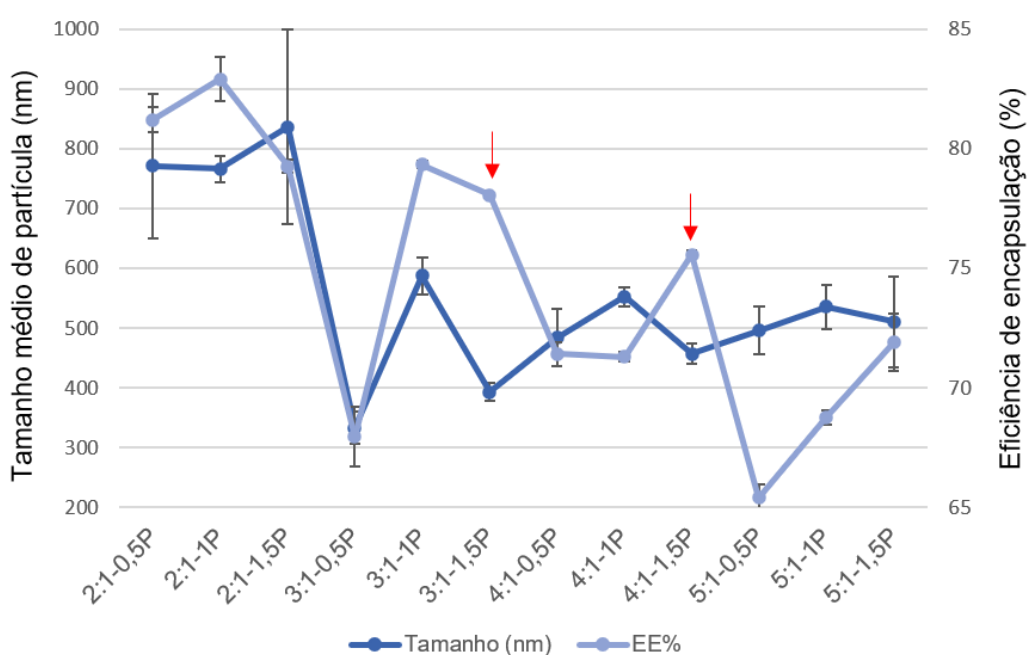


Figura 4.2 - Gráfico de relação entre os tamanhos médios de partículas e eficiências de encapsulação.

Diante disso, as análises discutidas nos tópicos subsequentes, inclusive os testes antimicrobianos e modificações do meio filtrante, foram realizadas para estas duas formulações de nanopartículas: NPs 3:1-1,5P e NPs 4:1-1,5P.

4.2.3 Microscopia eletrônica de alta resolução (MEV-FEG)

A análise morfológica foi realizada em duas etapas: primeiramente, avaliou-se a morfologia e tamanhos das partículas isoladas, e em seguida, avaliou-se a morfologia e distribuição das partículas já impregnadas no meio filtrante. A Figura 4.3 apresenta as imagens de MEV das nanopartículas de formulações 3:1-1,5P e 4:1-1,5P em duas concentrações (uma mais concentrada e outra mais diluída).

A partir das imagens obtidas, foi possível verificar o formato relativamente esférico das nanopartículas, para ambas formulações, típico de nanopartículas de quitosana. Observou-se também que, para a concentração de 10 mg/ml, as partículas encontram-se bem próximas, e a presença de alguns aglomerados (indicados pelas setas amarelas). Entretanto, de forma geral, ambas as amostras não apresentaram diferenças significativas em sua morfologia. Pan et al. (2020) [106] obtiveram partículas de quitosana/TPP com morfologia muito semelhante à obtida neste trabalho, assim como Ahmadi et al. (2018) [11], cujas partículas eram de quitosana/TPP com óleo essencial de *Satureja hortensis* encapsulado.

Ao analisar as micrografias das partículas, observou-se que estas apresentaram tamanhos inferiores àqueles dados pelo DLS. Utilizando o *software* Image J, duzentas medidas de diâmetro das nanopartículas foram coletadas de cada amostra, e o resultado da distribuição dos tamanhos estão apresentados nos histogramas da Figura 4.3 (c) e (f). A amostra 3:1-1,5P apresentou diâmetro médio de $73 \pm 15\text{nm}$ enquanto a amostra 4:1-1,5P apresentou diâmetro médio de $51 \pm 5\text{nm}$. Esta diferença no tamanho das nanopartículas obtidas pelas técnicas de DLS ($392,55 \pm 15,03\text{nm}$ e $457,04 \pm 17,78\text{nm}$) e MEV, podem ser atribuídas a perda de estabilidade da suspensão de nanopartículas e consequente aglomeração. Na Figura 4.3 (a), é possível notar dois grupos de aglomerados, indicados pelas setas amarelas, com tamanhos entre 300–450nm. De fato, a preparação das amostras para microscopia foi realizada imediatamente após a síntese, enquanto que as medidas de DLS foram realizadas aproximadamente 120 horas após a síntese. Neste momento, as suspensões apresentavam precipitados, e foram submetidas à banho de ultrassom de 15 minutos antes das medidas.

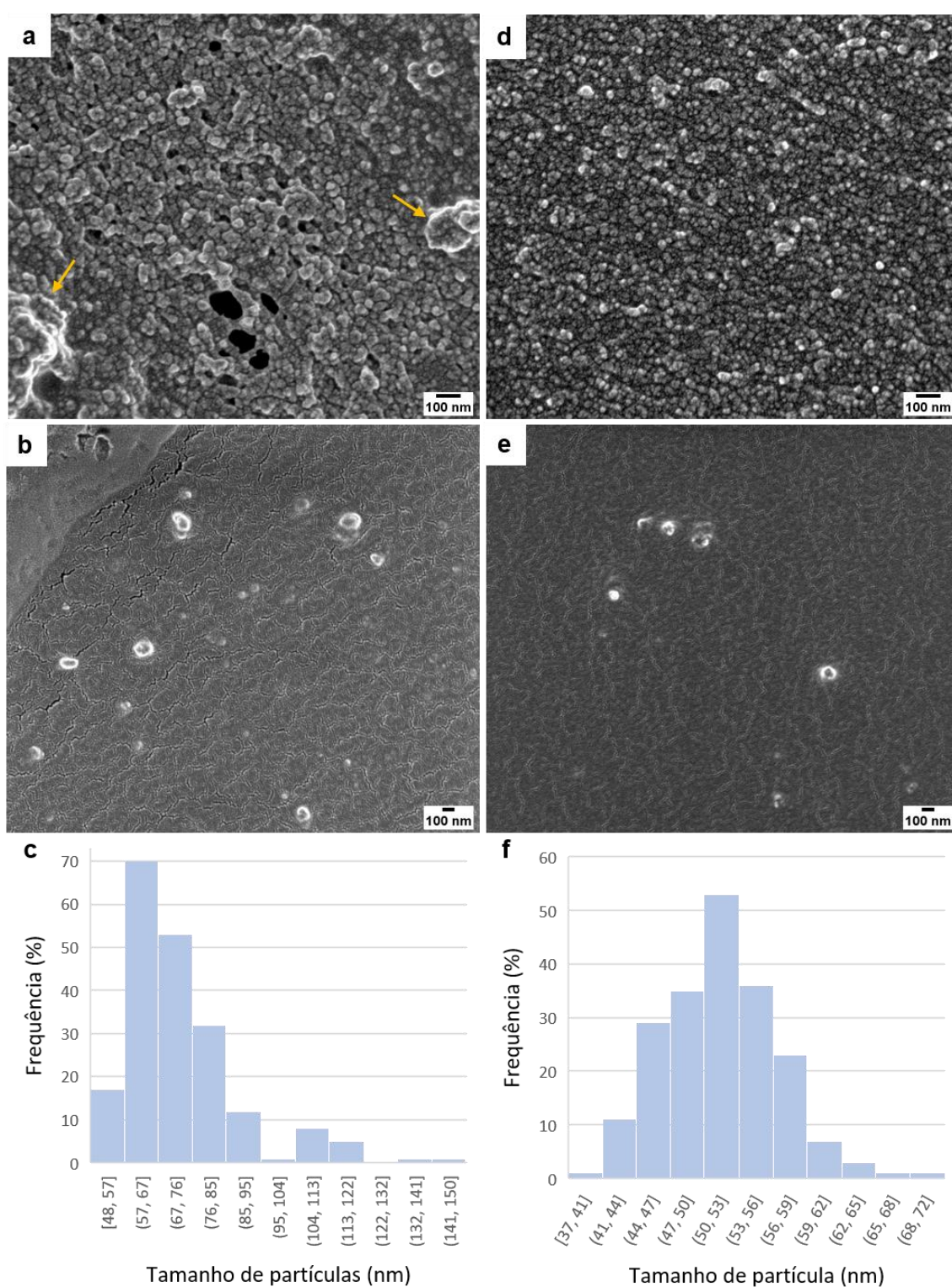


Figura 4.3 - MEV-FEG das partículas (a) 3:1-1,5P, 10mg/ml, (b) 3:1-1,5P, 0,01mg/ml, (d) 4:1-1,5P, 10mg/ml, (e) 4:1-1,5P, 0,01mg/ml. Histogramas (c) 3:1-1,5P e (f) 4:1-1,5P.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2020) [107]. Em seu estudo, própolis vermelha foi encapsulada em PLGA, e o diâmetro hidrodinâmico médio, dado por DLS, foi de $224,23 \pm 18,87\text{nm}$, enquanto o diâmetro médio determinado a partir das imagens de microscopia foi de $69 \pm 36\text{nm}$. Segundo os autores, essa diferença já era esperada, uma vez que o diâmetro hidrodinâmico revelado pela técnica DLS, reflete não somente o diâmetro da partícula em si, mas também a camada de dipolo elétrico aderida à sua superfície. Além disso, as medidas em DLS são feitas em suspensão, enquanto as microscopias são realizadas nas amostras secas. A quitosana, polímero hidrofílico, possui capacidade de absorção de água e podem inchar em solução, assim como o PLGA. Desta forma, além dos aglomerados serem mensurados como partículas únicas, a técnica DLS tende a indicar maiores tamanhos de partículas.

Apesar do processo de gelificação iônica ser relativamente simples, ele requer muito controle dos parâmetros envolvidos, sejam eles químicos (pH, concentração, razão quitosana/TPP, massa molecular, grau de desacetilação) ou experimentais (temperatura, taxa e tipo de agitação, taxa de adição do TPP). O pouco conhecimento da relação entre estes parâmetros dificulta o controle do processo em relação às propriedades desejadas.

Diante disso, para uma análise mais minuciosa dos resultados obtidos, o pH das soluções foi determinado e a razão molar teórica entre a quitosana e o TPP foi calculada (exemplo do cálculo para a determinação da razão molar encontra-se no Apêndice B). Estes e os demais parâmetros utilizados neste trabalho encontram-se na Tabela 4.4.

Os dados iniciais de concentrações das soluções e razões mássicas entre a quitosana e o TPP foram definidos a partir de trabalhos prévios envolvendo encapsulação de ativos em quitosana [11,61,110] e visando o desenvolvimento de processos escalonáveis para futuras aplicações, que requerem grandes volumes de produção [109].

Tabela 4.4 - Razões mássica e molar entre quitosana e TPP, concentrações e pH das soluções de quitosana e TPP, e tamanhos de partículas resultantes imediatamente após a síntese.

Amostra	2:1-1,5P	3:1-1,5P	4:1-1,5P	5:1-1,5P
Razão mássica QUI:TPP	2:1	3:1	4:1	5:1
Razão molar $\text{NH}_3^+ : \text{O}^-$ *	1:1.1	1.4:1	1.8:1	2.2:1
Concentração quitosana (mg/ml)	5	5	5	5
Concentração TPP (mg/ml)	5	5	5	5
pH (qui)	3.5	3.5	3.5	3.5
pH (TPP)	5.0	5.0	5.0	5.0
Tamanho médio (nm)	-	73 ± 15	51 ± 5	-

*Exemplo de cálculo da razão molar teórica encontra-se no Apêndice B.

Rázga et al. (2016) [110] desenvolveram um estudo correlacionando esses parâmetros, e avaliaram os impactos destes no tamanho e estabilidade das partículas. Ao avaliarem o efeito do pH, compararam sistemas com conformação estendida da quitosana (pH=3.5) com sistemas em que a conformação da quitosana era enrolada (pH=6.0), e obtiveram tamanhos de partículas de $50 \pm 10\text{nm}$ e $380 \pm 10\text{nm}$, respectivamente. Dentre a variedade de fatores que influenciam na obtenção das partículas, o grau de ionização (α) dos grupos amino da quitosana é especialmente importante, e diretamente relacionado ao pH da solução de quitosana. O pH determina a conformação das cadeias da quitosana ao alterar a acessibilidade e a disponibilidade dos grupos amino para a reticulação iônica. A quitosana completamente protonada exibe uma conformação “estendida”, em $\text{pH} \leq 3.5$, e apresenta uma mudança de conformação gradual conforme o pH se aproxima do $\text{pK}_a \approx 6.5$ da quitosana, em que atinge uma conformação “enrolada” ou “enovelada” [110]. Bugnicourt et al. (2014) [111] também avaliaram a influência do pH no tamanho médio das partículas, e obtiveram partículas entre 80 e 170nm, aumentando o pH de 4.0 para 5.5. Portanto, o efeito da razão entre a quitosana e o TPP é claramente

dependente do pH, para uma dada massa molecular e grau de desacetilação, uma vez que o pH determina a quantidade de grupos amino para a reação [112].

Em vista disso, é possível entender os tamanhos das partículas imediatamente após a síntese, determinados pelas imagens de microscopia. O pH da solução de quitosana era de 3.5, ou seja, as cadeias da quitosana encontravam-se na conformação mais estendida, e seus grupos NH_3^+ completamente protonados e disponíveis para interação, estado favorável à formação de partículas pequenas e organização compacta. Mesmo após a adição da solução de própolis, o pH manteve-se baixo (pH=4.45), possivelmente alterando minimamente a conformação das cadeias da quitosana. Diante disso, infere-se que as partículas resultantes conforme a adição de TPP, apresentaram tamanhos pequenos (visualizadas em MEV), anteriormente à formação de aglomerados (posteriormente detectados em DLS).

Ao avaliarem a concentração das soluções, Rázga et al. (2016) [110] confirmaram que esta influencia a estabilidade da suspensão e taxa de precipitação das partículas, mantendo os demais parâmetros constantes. Soluções de quitosana e TPP de 0,5mg/ml resultaram em partículas estáveis de $380 \pm 70\text{nm}$, enquanto que soluções de 5mg/ml (mesma concentração utilizada neste trabalho), apresentaram aglomerados de partículas e sedimentação destas. De acordo com Qun et al. (2006) [113], soluções de quitosana acima de 1,5mg/ml apresentam fortes ligações de hidrogênio intermoleculares e interações hidrofóbicas que quebram o equilíbrio entre as forças de atração e repulsão eletrostática entre as partículas na solução, induzindo a agregação das partículas formadas e precipitação. Nesta concentração, considerada a concentração crítica, a solução de quitosana passa do regime diluído, em que as moléculas se encontram separadas, com baixa probabilidade de interação, para semi-diluído, em que as moléculas se encontram mais próximas. Acima dela, no regime concentrado, ocorre uma interpenetração das cadeias poliméricas. Além disso, o tamanho das partículas também tende a aumentar com o aumento da concentração, devido à esta aproximação das cadeias (uma alta concentração envolve um maior número de cadeias numa mesma partícula) [112,113].

Segundo Bugnicourt et al. (2014) [111], para uma mesma concentração (avaliaram a concentração de 5mg/ml), a quantidade de TPP pode restringir o aumento no tamanho das partículas. Na amostra 4:1-1,5P, a quantidade de moléculas de TPP é menor que a quantidade presente na amostra 3:1-1,5P. Provavelmente, essa menor quantidade de moléculas disponíveis para interagir com as moléculas de quitosana pode resultar em menores tamanhos de nanopartículas, podendo reduzir a taxa de possíveis interações entre as partículas, responsáveis pela aglomeração. Por outro lado, os resultados obtidos por Rázga et al. (2016) [110] sugerem que, até uma certa razão entre os grupos NH_3^+ e O^- (5,3:1 até 2,1:1), o fator dominante no tamanho das partículas é a conformação da quitosana no processo de reticulação, onde a conformação enovelada (para $\text{pH} > 5.5$) e a blindagem de contra-íons favorecem o TPP. As partículas obtidas em $\text{pH}=6.0$, variando a razão molar até 2,1:1, apresentaram tamanhos médios em torno de 400nm. Aumentando a quantidade de TPP, de 2,1:1 até 1,4:1, observaram a formação de agregados na faixa de 460-970nm e subsequente separação de fases. Este fenômeno foi atribuído ao alcance de uma concentração crítica de TPP na solução sobre a quitosana, acima da qual uma intensa reticulação entre as partículas, via TPP, ocorreu, levando à aglomeração. Este comportamento também foi observado por Rampino et al. (2013) [114], bem como no presente trabalho.

É possível observar na Tabela 4.4, que todas as formulações utilizadas neste trabalho se encontram nesta faixa em que a quantidade de TPP provavelmente supera a concentração crítica e pode influenciar em uma reticulação entre as partículas, e, conseqüentemente, na formação de aglomerados. Além disso, para as formulações em que a razão mássica utilizada foi de 2:1, a quantidade de íons O^- superou a quantidade de íons NH_3^+ . Esta condição refletiu diretamente nos tamanhos dos aglomerados, identificados pela técnica DLS (Tabela 4.3), que alcançaram tamanhos médios na faixa de 300-900nm, aproximadamente, semelhantes aos resultados supracitados em [110].

A aglomeração contínua das partículas em suspensão reflete diretamente na estabilidade coloidal da mesma. A Figura A.1 no Anexo A mostra o impacto da razão molar entre os grupos NH_3^+ e O^- nos tamanhos das partículas, e

consequentemente, na estabilidade destas em suspensão. Partículas de razão molar 4,5:1 mostram-se estáveis ao longo do tempo, enquanto que, após aproximadamente 4h da síntese, as partículas de razão molar 1,4:1 começam a aglomerar, e após cerca de 9h, estas sedimentam [110]. Estes dados corroboram a falta de instabilidade observada nas amostras aqui obtidas, devido à presença de precipitação, notada visualmente após 1 dia da síntese. Além disso, como já observado na Figura 4.1, mesmo pouco tempo após a síntese, as suspensões com maior teor de TPP apresentavam maior opalescência, já indicando maiores tamanhos de partículas (ou aglomerados de partículas), como observado também por [114].

Após a modificação dos meios filtrantes com as amostras de nanopartículas, novas imagens foram obtidas, a fim de visualizar a presença e distribuição das nanopartículas nas fibras que compõem o filtro comercial. A Figura 4.4 apresenta estas imagens, em três magnificações, e em comparação com o filtro branco (sem nanopartículas).

As imagens que mostram o aspecto visual geral das fibras (mag. 300x) não aparentam diferenças significativas. Ao analisar uma fibra individual do filtro branco, é possível notar uma superfície lisa, com algumas ranhuras. Já nos filtros modificados, é possível notar as ranhuras da fibra e a presença das nanopartículas em suas superfícies. O filtro modificado com as nanopartículas de formulação 4:1-1,5P apresenta uma distribuição mais uniforme destas, em toda sua superfície. Já a fibra modificada com as nanopartículas 3:1-1,5P apresenta algumas regiões onde não foi verificada a presença de partículas. As fibras que compõem o filtro apresentaram diâmetros médios de $19 \pm 7\mu\text{m}$, dimensão bem superior aos diâmetros médios das partículas (73nm para NPs 3:1-1,5P e 51nm para NPs 4:1-1,5P). Esta diferença é claramente corroborada pelas imagens, que mostram partículas bem pequenas distribuídas em uma grande superfície. Este pode ser um indicativo de que a modificação deste filtro pode não afetar, ao menos de forma significativa, as características iniciais do filtro sem modificação.

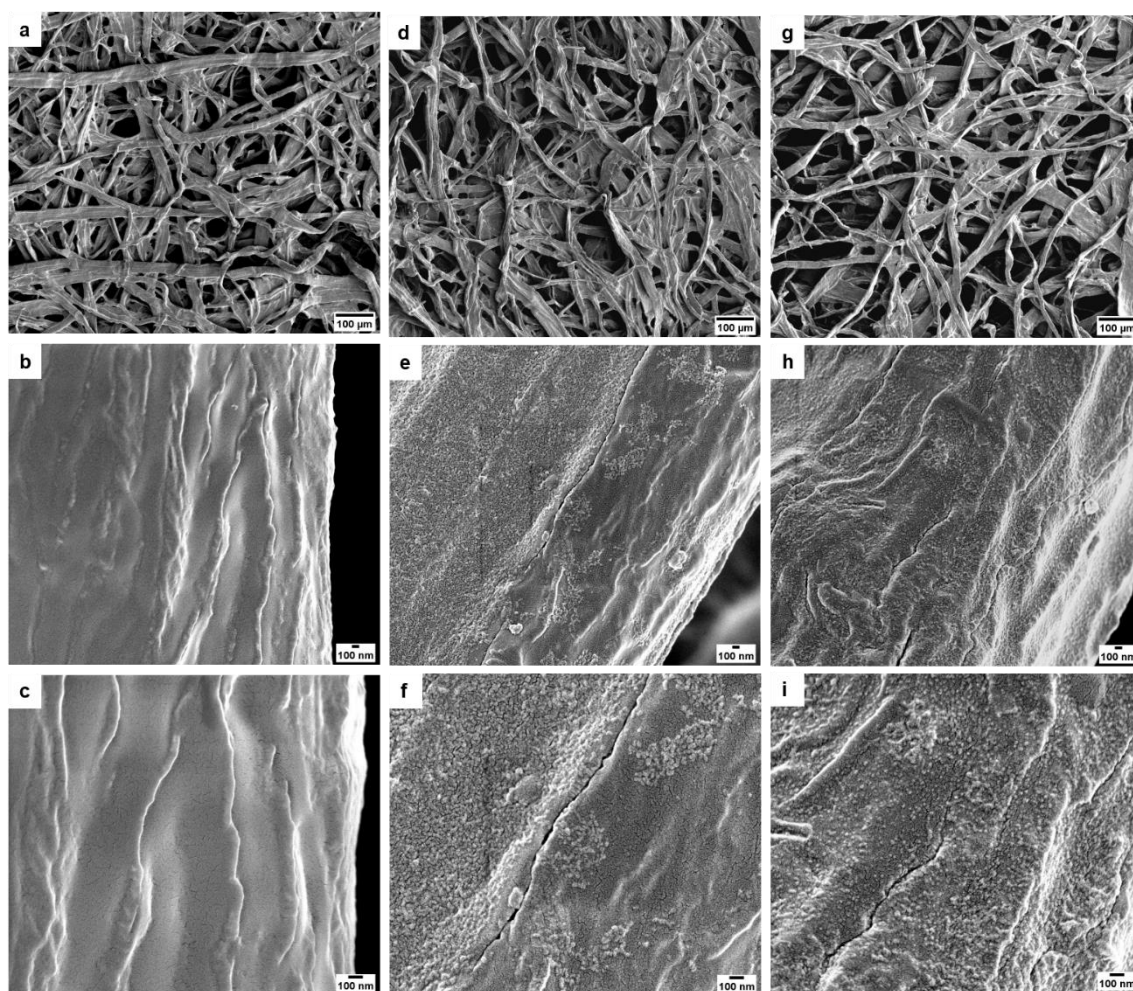


Figura 4.4 - MEV-FEG dos filtros a) branco, mag. 300x , b) branco, mag. 60000x, c) branco, mag. 120000x, d) modificado com 3:1-1,5P, mag. 300x, e) modificado com 3:1-1,5P, mag. 60000x, f) modificado com 3:1-1,5P, mag. 120000x, g) modificado com 4:1-1,5P, mag. 300, h) modificado com 4:1-1,5P, mag. 60000x, i) modificado com 4:1-1,5P, mag. 120000x.

4.3 Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)

A técnica FTIR foi utilizada para caracterizar e identificar os grupos funcionais das amostras de nanopartículas, de forma a corroborar a reticulação entre a quitosana e o TPP, e avaliar a encapsulação de forma qualitativa. A Figura 4.5 revela os espectros de cada componente utilizado na síntese das partículas, e os espectros das nanopartículas.

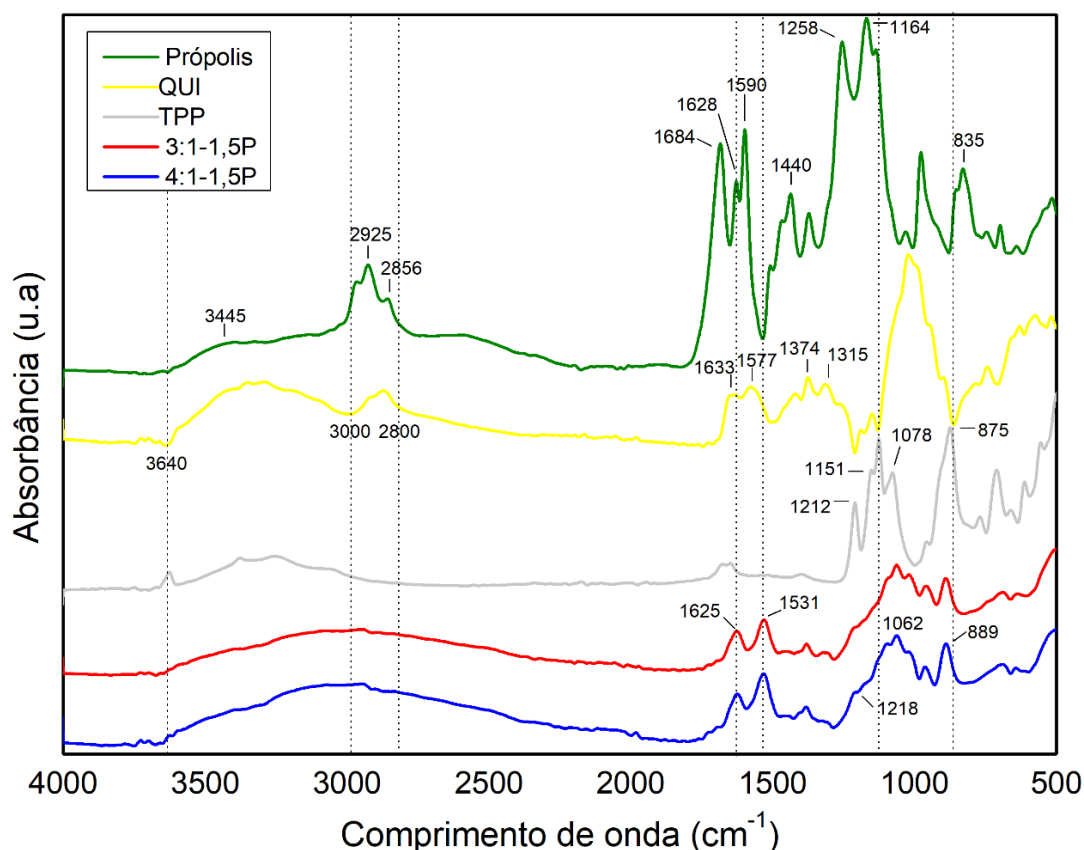


Figura 4.5 - Espectros FTIR do extrato de própolis, quitosana, TPP, nanopartículas 3:1-1,5P e nanopartículas 4:1-1,5P.

O espectro da própolis apresenta uma banda larga em 3445 cm^{-1} , atribuída à vibração de estiramento de grupos hidroxilas (O-H), típico de compostos fenólicos. As absorções em 2925 cm^{-1} e 2856 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, de C-H de grupos alifáticos (CH_2 e CH_3). Já a banda em 2975 cm^{-1} indica estiramento de C-H em aromáticos. As bandas entre 1684 cm^{-1} e 1628 cm^{-1} são características da vibração de estiramento de C=O, presente numa grande quantidade de compostos aromáticos, tais como os flavonóides. Em 1590 cm^{-1} e 1440 cm^{-1} tem-se estiramento de C=C, atribuídas também aos anéis aromáticos de flavonóides, como a quercetina. O espectro também revelou bandas intensas em 1258 cm^{-1} , 1164 cm^{-1} e 1033 cm^{-1} , atribuídas às vibrações de estiramento da ligação C-O de polióis, ésteres e éteres aromáticos. Por fim, a banda presente em 835 cm^{-1} indica vibração de deformação de C-H fora do plano.

De modo geral, os espectros para o extrato de própolis podem variar bastante, dependendo do tipo e da origem do extrato. Apesar disso, espectros semelhantes ao obtido neste estudo têm sido reportados na literatura, apresentando as principais bandas de absorção para a própolis. Sharaf et al. (2013) [91] e Zhang et al. (2018) [115] obtiveram em seus espectros bandas em 3433 cm^{-1} e 3413 cm^{-1} , respectivamente, atribuídas ao modo vibracional de estiramento do grupo O-H. O primeiro também relatou bandas entre 2927 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} atribuídas à vibração de estiramento assimétrico e simétrico de C-H em hidrocarbonetos, e o segundo obteve uma banda em 2981 cm^{-1} , também atribuída ao estiramento de CH_2 . Silva et al. (2020) [107] encontraram bandas características entre 1680 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} , as quais são atribuídas a estiramento de C=O de carbonila e/ou grupos aromáticos. As vibrações de estiramento em C=C atribuída à compostos aromáticos, também foi reportada por diversos estudos envolvendo extrato de própolis [84,115–117]. Patil et al. (2015) [117] atribuíram a banda em 1250 cm^{-1} à fenóis (hidroxi-flavonóides). Bandas de absorção em torno de 1160 cm^{-1} foram atribuídas a vibrações de estiramento do grupo C-O em lipídeos, e de dobramento de C-OH de álcoois [118]. As bandas em 1152 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} observadas nos espectros da própolis, correspondem, segundo Sharaf et al. (2013) [91] e Nascimento et al. (2019) [116], à vibrações de estiramento de C-O de ésteres e éteres, respectivamente. Nascimento et al. (2019) [116] também relatou uma banda em exatamente 835 cm^{-1} , a qual foi atribuída à vibração de deformação de C-H.

O espectro FTIR da quitosana apresenta uma banda larga entre 3640 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} . Esta banda está associada a uma sobreposição de vibrações de estiramento de O-H do grupo hidroximetil ($\text{CH}_2\text{-OH}$) e de N-H dos grupos amina I (R-NH_2) e amida II, presentes na estrutura química da quitosana. Outra banda foi observada entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} , característica de vibrações de estiramento da ligação C-H. A banda de absorção presente em torno de 1633 cm^{-1} pode ser atribuída à -C- , relacionada com o grupo dos aminoacetilados, à presença do grupo NH_2 , ou ainda ao estiramento de C=O do grupo alcila de amidas. Em 1577 cm^{-1} , encontra-se outra banda característica de vibrações de dobramento de N-H. As bandas 1374 cm^{-1} e 1315 cm^{-1} são características dos

grupos CH_3 e C-O, respectivamente [119]. Uma banda bem intensa foi identificada no espectro da quitosana, entre 1130 cm^{-1} e 860 cm^{-1} , aproximadamente. Bandas nesta região são atribuídas às vibrações das ligações das estruturas de polissacarídeos: C-O, C-C, C-H.

Ahmadi et al. (2018) [11] obtiveram uma banda larga no espectro da quitosana em torno de 3400 cm^{-1} . Uma banda entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} também foi obtida no estudo de Pan et al. (2020) [120], a qual foi atribuída à estiramentos em C-H. Yang et al. (2009) [121] atribuíram a banda em 1647 cm^{-1} ao estiramento de N-H da amida I. Já Li et al. (2012) [122] também identificaram uma banda em 1647 cm^{-1} , e a atribuíram ao estiramento de C=O do grupo acetil da amida I. Por outro lado, Sobreira et al. (2020) [119] observaram uma banda em 1639 cm^{-1} , a qual foi atribuída à ligação -C- de aminoacetilados. Espectros da quitosana de outros estudos apresentaram bandas em 1595 cm^{-1} (dobramento e estiramento de N-H), e em 1561 cm^{-1} (ligação C-N-H) [11,119]. Bandas intensas entre os comprimentos de onda 1130 cm^{-1} e 800 cm^{-1} também foram identificadas em outros espectros FTIR da quitosana, e atribuídos ao estiramento das ligações C-C, C-H e C-O [115,119].

A Tabela 4.5 sumariza as posições das bandas identificadas e suas atribuições para o extrato de própolis e quitosana.

A atribuição das bandas de absorção do TPP foi a seguinte: bandas entre 1212 cm^{-1} e 1078 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento de P=O, e a banda em 875 cm^{-1} , estiramento de P-O juntamente com P-O-P. Os espectros obtidos nos estudos de Pan et al. (2020) [106] e Antoniou et al. (2015) [123], apresentaram bandas semelhantes, entre 1200 cm^{-1} - 1080 cm^{-1} , e em 899 cm^{-1} .

Os espectros das nanopartículas para as duas formulações analisadas (3:1-1,5P e 4:1-1,5P) são bastante similares. As bandas em torno de 3400 cm^{-1} características de estiramentos de O-H (para própolis e quitosana) e N-H (quitosana) aparecem nos espectros das NPs descoladas para em torno de 3000 cm^{-1} e bem mais larga. Estas frequências vibracionais devem ter se acoplado, sendo um indicativo de estiramento de N-H e aumento significativo das ligações de hidrogênio intermoleculares [116]. As bandas em 1577 cm^{-1} e 1633 cm^{-1} , referente às ligações N-H da quitosana foram deslocadas para 1531 cm^{-1} e 1625

cm^{-1} , respectivamente. A presença das bandas em 1218, 1062 e 889 cm^{-1} nos espectros das NPs, referentes aos estiramentos de P=O, P-O e P-O-P sugerem que o TPP foi incorporado pela quitosana, corroborando as interações eletrostáticas entre eles. Além disso, as bandas abaixo de 790 cm^{-1} do TPP não aparecem nos espectros das NPs devido às restrições conformacionais geradas pela complexação [124].

Tabela 4.5 - Bandas de absorção identificadas nos espectros da própolis e quitosana, e seus respectivos modos de vibrações.

Própolis		Quitosana	
λ (cm^{-1})	Modo vibracional	λ (cm^{-1})	Modo vibracional
3445	Estiramento de O-H	3640 - 3000	Estiramento de O-H
2925	Estiramento assimétrico de C-H		Estiramento de N-H
2856	Estiramento simétrico de C-H	3000 - 2800	Estiramento C-H
1684	Estiramento de C=O	1633	Estiramento de N-H
1628	Estiramento de C=O		Estiramento de C=O
1590	Estiramento de C=C	1577	Dobramento de N-H
1440	Estiramento de C=C	1374	Estiramento de C-H
1258	Estiramento de C-O	1315	Estiramento de C-O
1164	Estiramento de C-O	1130 - 860	Estiramento de C-C
1033	Estiramento de C-O		Estiramento de C-H
835	Deformação de C-H		Estiramento de C-O

Além do aumento das ligações O-H, o desaparecimento e/ou redução da intensidade das bandas entre aproximadamente 1500-1280 cm^{-1} , referentes à estiramentos C=C, C-H e C-O, sugere interação entre a quitosana e a própolis, evidenciando a presença desta na composição [83]. Já o desaparecimento das bandas de absorção características de flavonóides, lipídeos e álcoois em 1684, 1258, 1164 e 835 cm^{-1} , tendo sido fundidos ou sobrepostos pelas bandas de absorção da matriz polimérica, sugere o encapsulamento da própolis [115,116].

4.4 Análises Microbiológicas

Primeiramente, foi realizado um teste para avaliar a sensibilidade das cepas de bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e gram-negativas (*E. coli*) frente às nanopartículas depositadas nos filtros. Utilizando-se do método de difusão em disco, é possível observar um halo de inibição ao redor da amostra, caso o analito tenha atividade frente às bactérias em análise. Na Figura 4.6 estão apresentados os resultados dos Testes de Difusão. Na figura, a amostra de controle (branco) é representada pela letra “c”, e as siglas S.a. e E.c. indicam as cepas *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

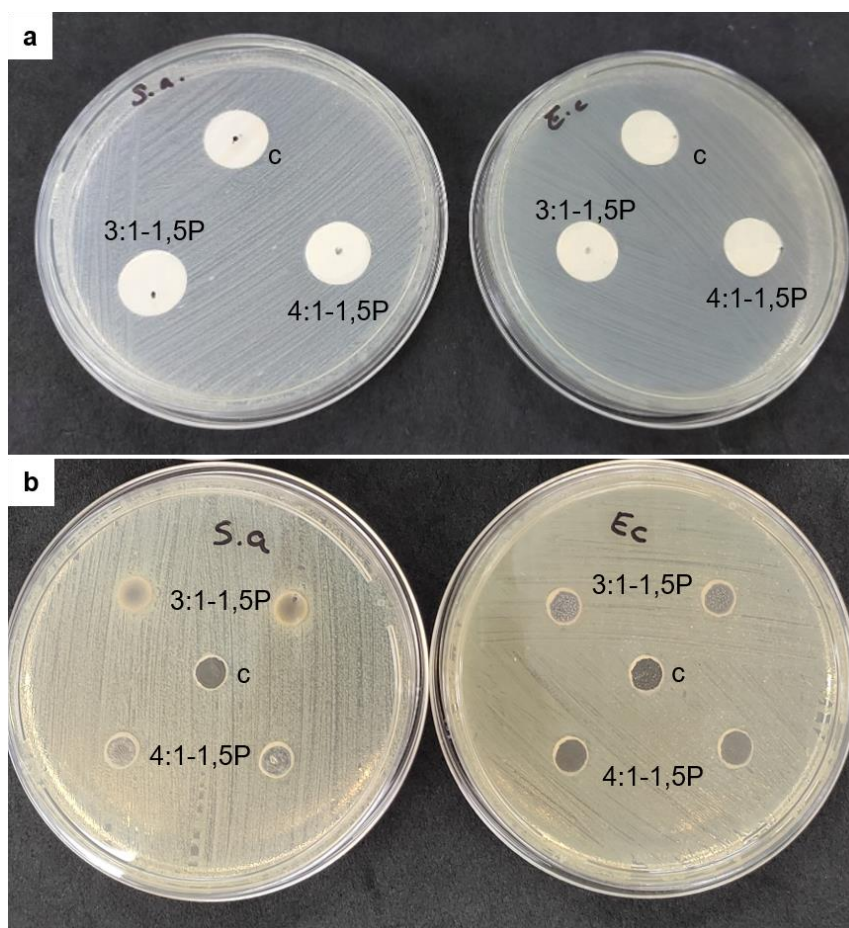


Figura 4.6 - Placas de teste para o método de difusão (a) em disco e (b) poços.

Observa-se que a Figura 4.6 (a) não apresentou halo de inibição para nenhum dos discos (filtros) contendo as nanopartículas indicadas. A fim de corroborar este resultado (que foi realizado em triplicata), foi realizado um teste

utilizando-se somente as nanopartículas na análise. Para isto, o Método de Poços foi utilizado. Nesta análise, o teste de difusão é feito, adicionando-se uma alíquota da suspensão de nanopartículas em poços previamente feitos no ágar com o auxílio de um perfurador de metal esterilizado. Após o período de 24h de incubação, as placas que compõem a Figura 4.6 (b) foram observadas. Novamente, nenhum halo de inibição foi observado, exceto um pequeno indício de formação de halo, para a suspensão de partículas 3:1-1,5P na placa de *S. aureus*.

O princípio deste método baseia-se na difusão das nanopartículas através do ágar, levando à formação do halo de inibição, que por sua vez, apresenta um diâmetro inversamente proporcional à concentração mínima inibitória (MIC) do antimicrobiano. A quitosana, polímero hidrofílico, assim como a própolis, são substâncias capazes de difundir pelo ágar *Mueller Hinton*, e possuem atividade antimicrobiana comprovada. Neste caso, o fator limitante na utilização deste método, provavelmente foi a concentração de nanopartículas utilizada na análise. De fato, as concentrações das suspensões utilizadas neste primeiro momento foram de aproximadamente 2,2mg/ml para a amostra 3:1-1,5P, e 0,7mg/ml para a amostra 4:1-1,5P, valores bem abaixo dos encontrados na literatura para nanopartículas semelhantes.

A atividade antibacteriana de partículas de própolis foi analisada por Abdullah et al. (2019) [125] pelo método de difusão em disco para bactérias gram-positivas e gram-negativas. A suspensão de partículas, com 20mg/ml de concentração, resultou em halos de inibição de $17 \pm 2,5$ mm para *S. aureus* e de $8,3 \pm 0,5$ mm para *E. coli*. Divya et al. (2017) [126] obtiveram nanopartículas de quitosana por gelificação iônica com tamanhos entre 20-70nm, e as avaliaram frente a diferentes bactérias. Como resultados, obtiveram halos de inibição de 10,3mm para *S. aureus*, e de 9,6mm para *E. coli*, sendo as concentrações de NPs utilizadas para cada cepa de 30mg/ml e 50mg/ml, respectivamente.

Diante disso, julgou-se necessário determinar a concentração mínima inibitória (MIC) para as nanopartículas, que é a concentração mínima necessária para inibir de fato o crescimento dos microrganismos. A Figura 4.7 mostra a placa

de 96 poços utilizada no método de microdiluição para a determinação da MIC, antes e depois do período de incubação.

Na primeira parte da placa (lado esquerdo), demarcada na Figura 4.7 (b), foi analisada a ação das nanopartículas frente à *S. aureus*, e na segunda parte (lado direito), frente à *E. coli*. Os poços que apresentam coloração azulada são aqueles em que a inibição bacteriana ocorreu, para a concentração de nanopartículas, em mg/ml, indicada ao lado esquerdo de cada linha.

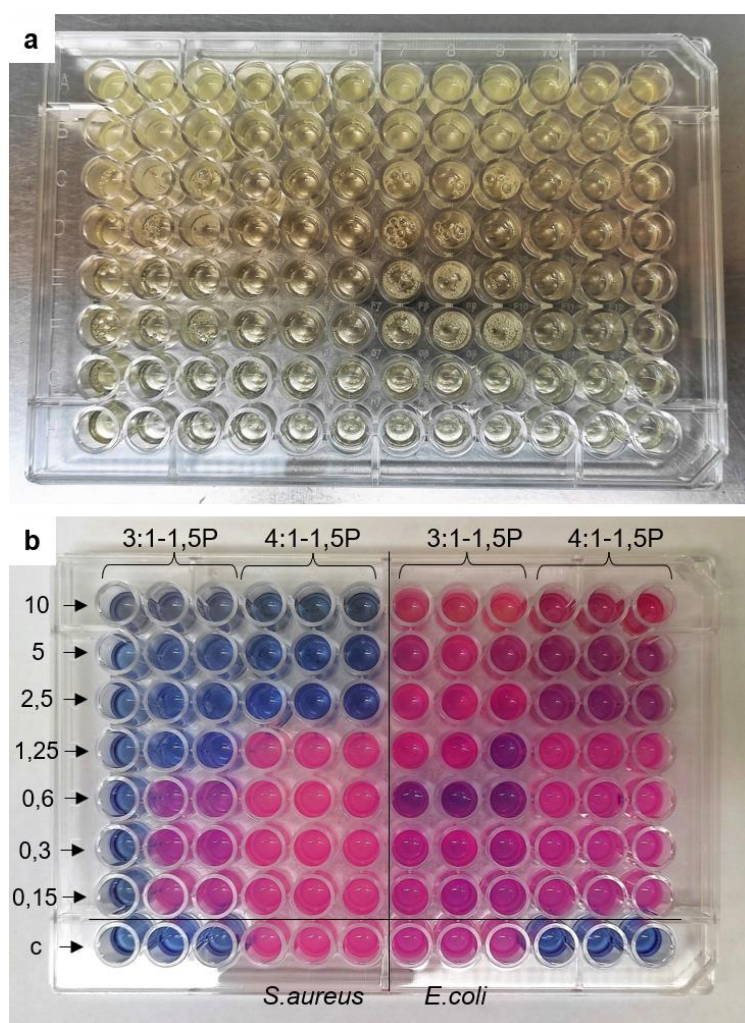


Figura 4.7 - Avaliação da Concentração Mínima Inibitória (MIC). a) Placa imediatamente antes da incubação. b) Placa após 24h de incubação à 37°C.

As NPs de formulação 3:1-1,5P inibiram o crescimento da *S. aureus* nas concentrações de 10, 5, 2,5mg/ml, tendo como concentração mínima 1,25mg/ml. Para as concentrações menores, apenas um poço de cada triplicata exibiu

coloração azul, enquanto os outros dois poços mantiveram a coloração rosada, não sendo possível portanto afirmar que houve inibição nestas concentrações. Já a formulação 4:1-1,5P apresentou MIC de 2,5mg/ml, tendo as concentrações mais baixas evidenciado crescimento bacteriano. De acordo com o resultado do diâmetro hidrodinâmico fornecido pela análise DLS, esta amostra tendeu a apresentar tamanhos médios de aglomerados maiores (457nm) que a formulação 3:1-1,5P (392nm). Esta menor área superficial disponível para interagir com os microrganismos pode ser responsável pelo maior valor de MIC para as NPs 4:1-1,5P. Por outro lado, frente à *E. coli*, nenhuma formulação apresentou inibição bacteriana para as concentrações avaliadas.

Mascheroni et al. (2014) [127] avaliaram a MIC para partículas de quitosana e própolis obtidas via técnica de encapsulamento de membrana, e obtiveram concentração mínima de 0,8mg/ml frente *S. aureus* e de 1mg/ml para *E. coli*. Já Pereira, K.J.G (2020) [128] desenvolveu nanopartículas de quitosana/PLA contendo própolis, e obteve MICs de 5mg/ml e 10mg/ml para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente.

Nori et al. (2011) [129], encapsularam própolis numa matriz de proteína isolada de soja e pectina, via coacervação, e a concentrações mínimas inibitórias das microcápsulas obtidas foram avaliadas frente a *S. aureus* e *E. coli*. Somente os microrganismos *S. aureus* foram afetados pela ação das microcápsulas de própolis, apresentando uma MIC em torno de 0,2-0,4mg/ml. Apesar de uma MIC bem menor que a do presente trabalho, também não foi identificada ação inibitória frente à cepa *E. coli*.

De modo geral, as bactérias gram-positivas possuem um envelope relativamente simples, caracterizada pela presença de uma membrana celular citoplasmática circundada por uma parede celular relativamente porosa, permitindo uma maior difusão dos compostos ativos. Já a parede celular das bactérias gram-negativas é quimicamente mais complexa. Elas possuem uma camada externa adicional, constituída por fosfolipídeos, proteínas, e lipopolissacarídeos, com o propósito de manter a integridade da parede celular, sendo impermeável à maioria dos íons (Na, K, H) e moléculas polares não carregadas [107,129].

A quitosana apresenta um largo espectro de atividade antimicrobiana, e sua eficiência frente aos microrganismos depende de inúmeros fatores, tais como o tipo de microrganismo, seu grau de desacetilação, e conseqüentemente, a densidade de cargas positivas (NH_3^+), e até mesmo fatores ambientais [130]. Assim sendo, foi possível encontrar na literatura valores de MIC para partículas de quitosana de 0,085mg/ml, 0,225mg/ml, 30mg/ml, até mesmo 50mg/ml [126,131,132]. Com relação ao extrato de própolis, Ong et al. (2017) [108] explicam que a própolis possui carga superficial negativa, levando à uma interação mais fraca entre a sua superfície e as bactérias gram-negativas, devido à presença de forças repulsivas. Embora, de uma forma geral, o mecanismo de ação da própolis ainda não tenha sido completamente elucidado, a sua atividade frente aos microrganismos tem sido atribuída à sua complexa composição e sinergia entre suas substâncias ativas, como os já citados flavonóides, que dificultam os mecanismos de defesas dos microrganismos. Por conseguinte, os valores de MIC para a própolis encontrados na literatura são relativamente baixos, em especial frente às cepas de bactérias gram-positivas; 0,075mg/ml [131], 0,125mg/ml, 3,1mg/ml [107] para *S. aureus*, e 2,5mg/ml [128] para *E. coli*.

Apesar de as NPs não terem apresentado atividade inibitória frente a cepa gram-negativa nas concentrações avaliadas, a MIC frente à *S. aureus*, de 1,25mg/ml, determinada neste trabalho, encontra-se próxima e competitiva com os dados encontrados na literatura. Em comparação com a própolis pura, as nanopartículas de quitosana/própolis apresentaram atividade antibacteriana em uma concentração maior. Apesar de a quitosana também apresentar inibição frente a *S. aureus*, ela isoladamente pode não ser suficiente para atacar estes microrganismos nas concentrações avaliadas. Por sua vez, ela permite uma liberação controlada dos ativos da própolis com o tempo, o que pode justificar uma menor atividade antimicrobiana inicial, ao menos nas primeiras 24h, permitindo neste primeiro momento, o crescimento dos microrganismos. Lozano & Torres (2017) [133] também destacam que uma das vantagens do encapsulamento da própolis se deve a maior chance de as NPs penetrarem e agirem internamente na célula bacteriana, uma vez que a própolis é composta por substâncias hidrofóbicas com baixa permeação em meios aquosos. Estes

dados sugerem que um maior tempo de exposição das bactérias aos antimicrobianos encapsulados pode resultar em uma maior atividade, ou ainda, em menores concentrações necessárias para a inibição.

Em face do exposto, avaliação da concentração mínima inibitória permitiu concluir que as NPs aqui desenvolvidas possuem ação antimicrobiana -fato que não foi possível confirmar apenas com o método de difusão-, além de determinar as concentrações mínimas nas quais estas nanopartículas são eficazes. Além disso, é possível aceder que a eficácia antimicrobiana dos agentes depende diretamente do tamanho das partículas, da sua concentração e do tempo de exposição aos microrganismos.

De forma adicional, a fim de verificar se as concentrações inibitórias encontradas para as amostras frente à *S. aureus* também agem como bactericidas, uma alíquota de cada poço azul foi gotejada numa placa com ágar TSA, e incubada por mais 24h à 37°C. O resultado encontra-se na Figura 4.8.



Figura 4.8 - Placa de teste rápido MBC.

Enfim, após avaliar a atividade bacteriana das amostras de forma qualitativa, e determinar a concentração final de trabalho das suspensões de NPs, foi realizado o teste de contato, o qual avalia-se de forma quantitativa a ação das NPs, agora já impregnadas no filtro.

A Figura 4.9 apresenta as imagens das placas semeadas com as suspensões bacterianas, após a diluição seriada e período de incubação (triplicatas).

Na primeira coluna de cada conjunto de placas estão os controles (placas sem adição das nanopartículas), a segunda coluna refere-se à formulação 3:1-1,5P, e a terceira, à formulação 4:1-1,5P. Na primeira linha de cada conjunto de placas tem-se a primeira diluição (10^{-1}), na segunda linha a segunda diluição (10^{-2}), e na terceira, a mais diluída (10^{-3} em relação à suspensão pura).

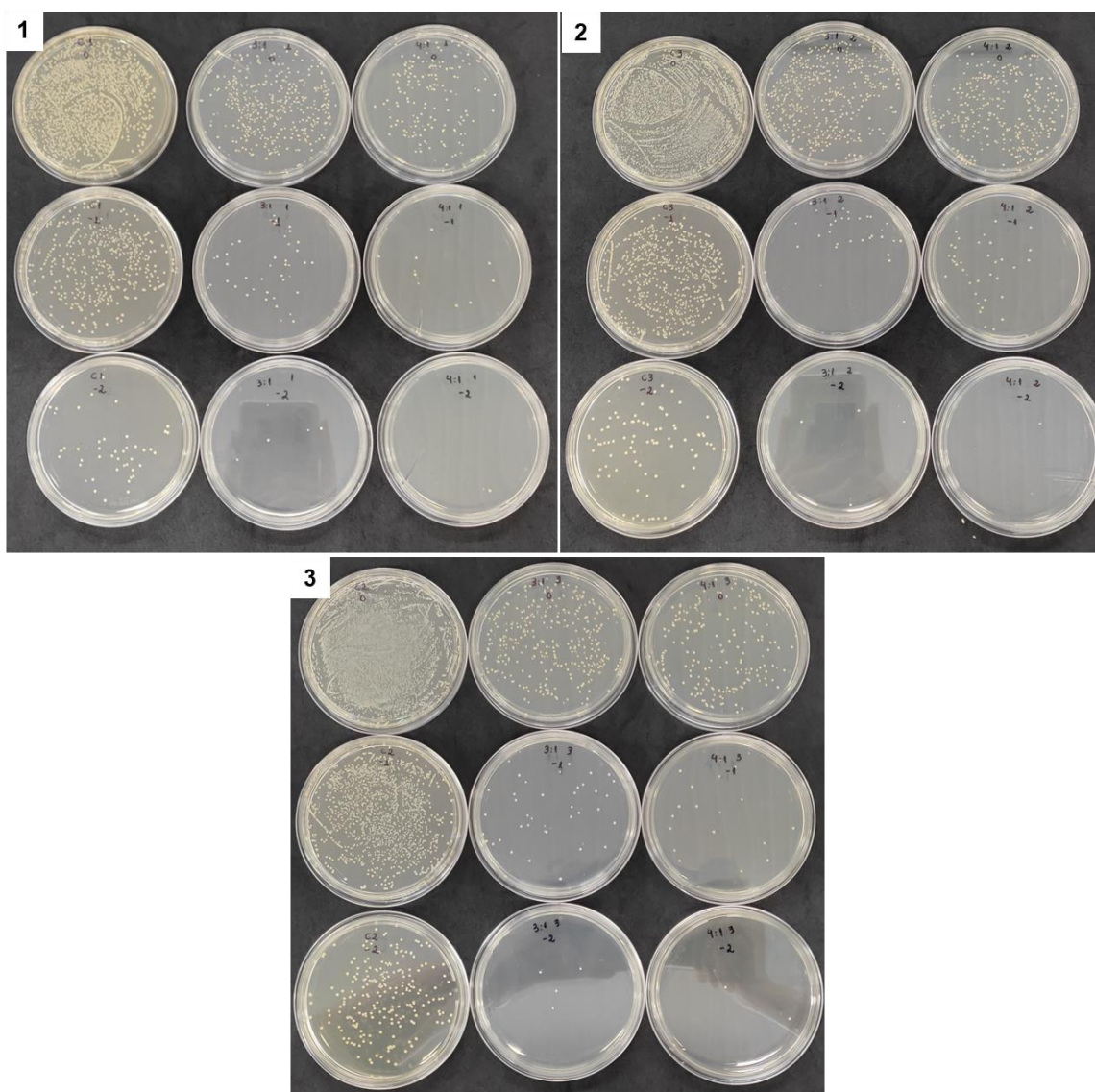


Figura 4.9 - Placas para contagem das colônias de bactérias. Ensaio realizado em triplicata, identificadas por 1, 2 e 3.

Após as diluições, é possível fazer a contagem das unidades formadoras de colônias presentes nas placas. Na Tabela 4.6 encontram-se os dados obtidos do crescimento bacteriano após a contagem das placas, e na Figura 4.10, o gráfico de redução bacteriana, com os resultados expressos em escala logarítmica.

Tabela 4.6 - Resultados do crescimento bacteriano, em UFC/mL, e o percentual de redução em relação ao controle.

Amostra	UFC/mL	% Redução
Controle	$1,52 \times 10^6$	0
3:1-1,5P	$4,33 \times 10^4$	97,14 %
4:1-1,5P	$3,29 \times 10^4$	97,82 %

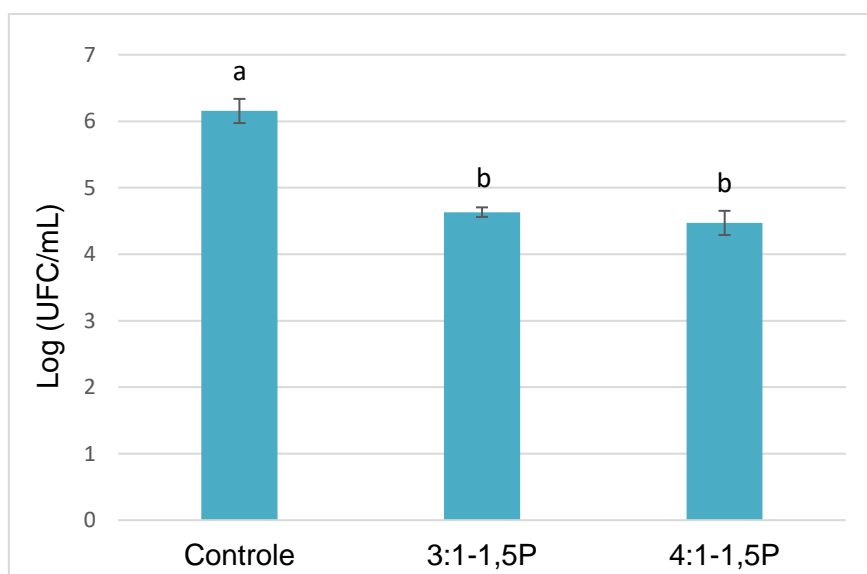


Figura 4.10 - Contagem logarítmica de bactérias (*S. aureus*) para o controle e as amostras estudadas. Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Com os resultados supracitados, observou-se que a modificação do filtro comercial com as nanopartículas de quitosana e própolis possibilitou a redução do número de bactérias presentes na suspensão bacteriana inicial. Em relação ao controle, a redução do crescimento bacteriano do filtro contendo as nanopartículas 3:1-1,5P foi de 1,5 log (UFC/ml) e para as nanopartículas 4:1-

1,5P de 1,7 log (UFC/ml). Expressando este resultado em porcentagem, obteve-se uma redução de 97,14% e 97,82% para as NPs 3:1-1,5P e 4:1-1,5P, respectivamente.

Posto isso, infere-se que filtros modificados com ambas as formulações de nanopartículas aqui trabalhadas (NP 3:1-1,5P e NP 4:1-1,5P), à uma concentração de 10mg/ml, apresentam altas taxas de redução bacteriana para bactérias gram-positivas, acima de 97%, e bom potencial para apresentar eficácia frente a outros microrganismos, tais como bactérias gram-negativas, fungos e vírus.

4.5 Testes de Filtração

Os testes de filtração foram realizados no filtro comercial branco (sem adição das NPs), e nos filtros modificados com ambas as formulações de nanopartículas (NPs 3:1-1,5P e NPs 4:1-1,5P), todos em triplicatas.

A permeabilidade de um meio filtrante é uma estimativa da facilidade de passagem do fluido, neste caso, o ar, através do filtro, ou seja, quanto maior seu valor, menor é a resistência à passagem do ar. Nos ensaios, a vazão do ar foi variada de 0-10 L/min, em uma área de filtração de 5,2cm² (área dos filtros), sendo a viscosidade do ar 1,74×10⁻⁵ Pa.s e a espessura dos filtros (L) 0,062cm. As constantes de permeabilidade (k_1) foram obtidas através das curvas de queda de pressão *versus* velocidade superficial, apresentadas no Apêndice C, em que μ/k_1 (da Lei de Darcy, Equação 2.3), corresponde ao coeficiente angular das retas.

A eficiência de coleta de partículas para cada filtro também foi determinada, para partículas de NaCl de diâmetros entre 6nm e 240nm. A Figura 4.11 mostra a distribuição dos diâmetros das partículas geradas. A velocidade superficial de filtração foi de 4,9cm/s e a área do filtro manteve-se em 5,2cm². A concentração de partículas na entrada e na saída do filtro é determinada pelo analisador de partículas SMPS e a eficiência de coleta de partículas (η) é dada pela Equação 2.1.

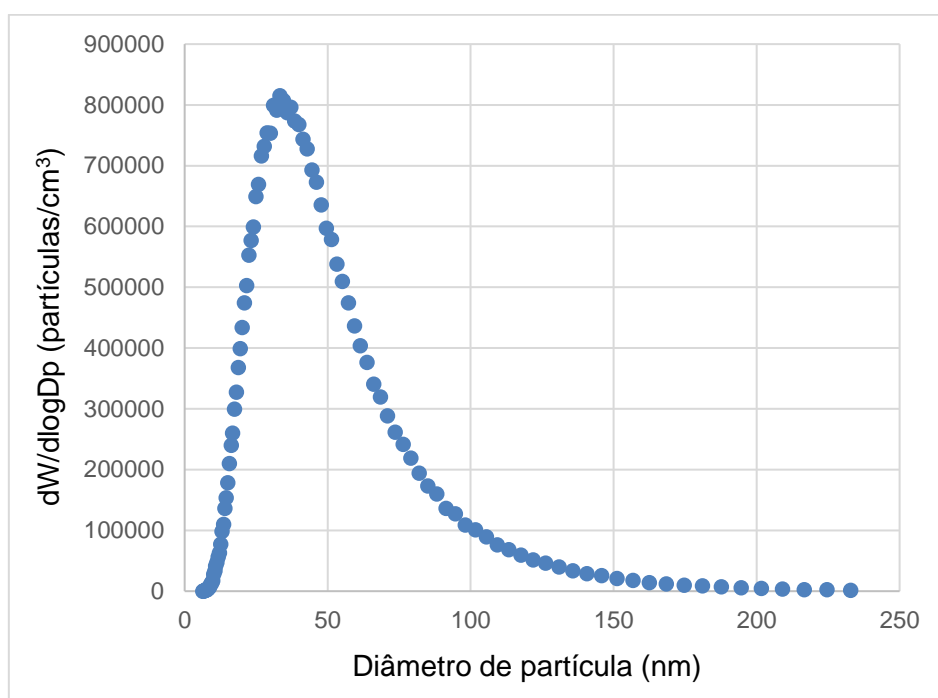


Figura 4.11 - Distribuição do diâmetro de partículas, geradas a partir da solução de NaCl.

A Tabela 4.7 apresenta os coeficientes de permeabilidade, eficiências de coleta (para partículas na faixa de 6 - 240nm), quedas de pressão (para vazão de 1,5L/min) e fator de qualidade para os filtros branco, modificado com partículas 3:1-1,5P e 4:1-1,5P, propriedades estas que serão analisadas na sequência.

Tabela 4.7 – Constantes de permeabilidade (k_1), eficiências de coleta (η) e fatores de qualidade (Q).

Amostra	Constante de Permeabilidade (m ²)	Eficiência de Coleta global (%)	Queda de pressão (Pa)	Fator de Qualidade (Pa ⁻¹)
Filtro branco	$1,07 \times 10^{-11}$	43,87	43,63	0,0055
Filtro + NPs 3:1-1,5P	$0,97 \times 10^{-11}$	47,76	50,07	0,0058
Filtro + NPs 4:1-1,5P	$1,03 \times 10^{-11}$	45,00	46,7	0,0052

No que tange à permeabilidade, o filtro branco apresentou o maior valor. Apesar da pouca diferença entre os resultados, este filtro é o que apresenta uma estrutura mais aberta, ou seja, mais poros. Este resultado é corroborado pelas curvas de queda de pressão da Figura 4.12.

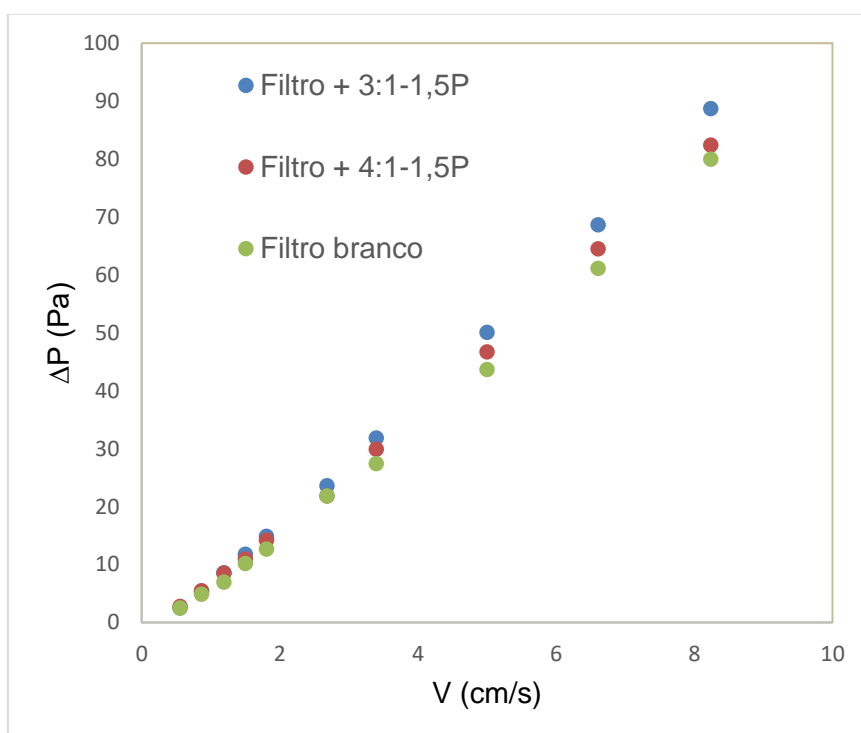


Figura 4.12 - Queda de pressão em função da velocidade superficial do ar.

O filtro branco é o que apresenta menores valores de queda de pressão com o aumento da vazão do ar, indicando uma maior facilidade da passagem do ar através das fibras. Neste sentido, o menor valor de permeabilidade para o filtro modificado com as nanopartículas 3:1-1,5P se dá devido à maior resistência à passagem do ar (maiores quedas de pressão), consequência da presença das partículas na superfície das fibras que compõem o filtro, resultando numa estrutura mais fechada (poros menores). Este mesmo comportamento é observado para o filtro modificado com as nanopartículas 4:1-1,5P, e a pouca diferença dos valores de permeabilidade pode ser atribuída à uma menor quantidade de partículas na sua superfície, ou uma menor quantidade de aglomerados, resultando num filtro com uma estrutura um pouco mais aberta (poros maiores).

De Barros et al. (2014) [134] avaliaram a deposição de partículas de NaCl em um filtro de celulose HEPA, e obtiveram uma permeabilidade de $1,89 \times 10^{-12} \text{ m}^2$, ou seja, a estrutura deste filtro possuía maior resistência à passagem de ar que o filtro de celulose utilizado neste trabalho. Bortolassi et al. (2019) [29] desenvolveram filtros de PAN (poliacrilonitrila) modificados com partículas de TiO_2 e ZnO , que apresentaram permeabilidades de $6,11 \times 10^{-13} \text{ m}^2$ e $9,17 \times 10^{-13} \text{ m}^2$, respectivamente, valores menores aos encontrados para os filtros deste trabalho. Rosa et al. (2017) [39] modificaram filtros de celulose com nanopartículas de prata de 50nm, e avaliaram a permeabilidade antes e após a modificação. Os valores obtidos antes ($4,6 \times 10^{-11} \text{ m}^2$) e depois da modificação ($4,5 \times 10^{-11} \text{ m}^2$) foram similares, indicando que as propriedades do filtro se mantiveram constantes com a impregnação das nanopartículas de prata.

A filtração de partículas como bioaerossóis e outros poluentes do ar é complexa e a boa performance do meio filtrante envolve a combinação das diferentes variáveis relacionadas à estrutura deste (permeabilidade, porosidade, queda de pressão, espessura das fibras). Portanto, a melhor configuração entre estes parâmetros resulta em uma melhor performance dos mecanismos de coleta, que por sua vez, influenciam diretamente na eficiência de filtração.

Sabendo a concentração de partículas antes e depois da sua passagem pelo filtro, foi possível determinar a eficiência de coleta para cada faixa de tamanho de partículas, e as eficiências de coleta global, que envolvem todos os mecanismos de coleta. Os valores de eficiência global para cada filtro estão apresentados na Tabela 4.7. Assim como as constantes de permeabilidade, as eficiências de coleta global não diferiram muito entre si, embora os filtros que foram modificados com as nanopartículas apresentaram eficiências um pouco maiores. O gráfico da Figura 4.13 apresenta as curvas de eficiência de coleta de cada filtro em função do diâmetro das partículas.

Observa-se que os filtros deste estudo apresentam altas eficiências de coleta para partículas bem pequenas, predominando, portanto, o mecanismo de coleta difusional. Conforme o tamanho das partículas aumenta, o mecanismo difusional é afetado negativamente, contribuindo para a redução da eficiência global. Para diâmetros de partículas a partir de aproximadamente 100nm,

observa-se os menores valores de eficiência de coleta. Esta faixa de tamanho de partículas, entre aproximadamente 100 e 300nm, corresponde às partículas mais penetrantes (MPPS) (ou regiões de mínima eficiência), para as quais nenhum mecanismo de coleta é predominante [135]. Estes tamanhos de partículas são considerados muito grandes para serem capturados por difusão, e muito pequenos para serem capturados por interceptação ou impactação inercial, e conseqüentemente, mais difícil é a sua captura, reduzindo a eficiência do filtro nesta faixa [29]. Para as partículas maiores que 200nm, observa-se uma crescente para as três curvas, indicando a predominância do mecanismo de impactação inercial ou de interceptação. Este comportamento indica, possivelmente, que estes filtros apresentam altas eficiências de coleta para partículas maiores que 250nm.

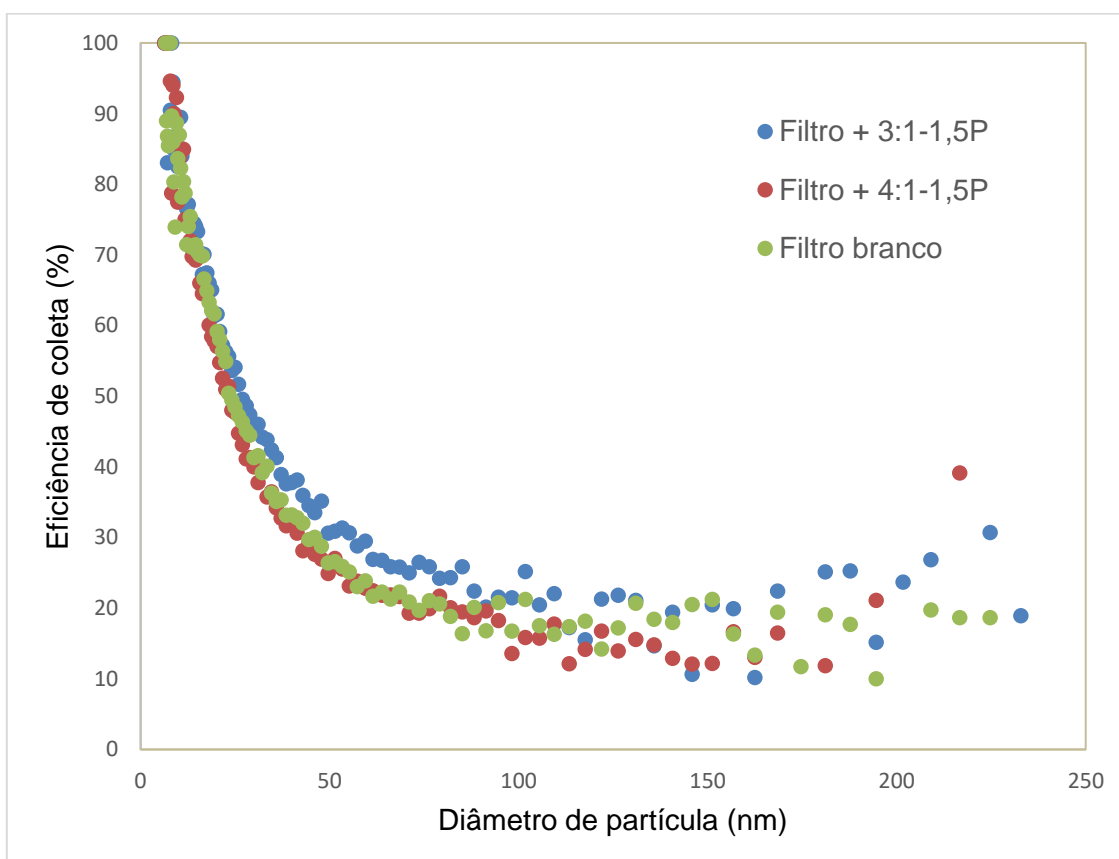


Figura 4.13 - Curvas de eficiência de coleta para a velocidade de filtração de 4,9 cm/s.

Meios filtrantes tradicionais com fibras em escala micrométrica, foram analisados por Zhu et al. (2017) [21], e também apresentaram baixas eficiências de filtração para partículas finas (0,1-0,5 μm), com uma tendência de eficiências maiores conforme os tamanhos das partículas aumentam. Esta baixa eficiência foi atribuída aos grandes tamanhos de poros geralmente formados por fibras micrométricas.

Um filtro com boa performance deve apresentar um equilíbrio entre eficiência de coleta e quedas de pressão. Neste sentido, o fator de qualidade (Q) é um fator adicional para avaliar a performance de meios filtrantes. Na Tabela 4.7 encontram-se os fatores de qualidade para os filtros branco e modificados, para partículas de 100nm. Altos valores de Q indicam que o filtro possui boa eficiência com baixa queda de pressão. Por esta razão, dentre os filtros analisados, o filtro modificado com NPs 3:1-1,5P foi o que apresentou um maior fator de qualidade (0,0058 Pa^{-1}). Ao comparar os fatores de qualidade de diferentes filtros, é importante atentar-se à faixa de tamanhos de partículas de interesse. Para os filtros aqui analisados, as eficiências de coleta para partículas de 100nm foram baixas (entre 21% e 25%, aproximadamente), o que levou à baixos valores de Q. Fatores de qualidade entre 0,003 e 0,008 Pa^{-1} foram obtidos para filtros de outros estudos [136,137].

Embora o meio filtrante aqui avaliado tenda a apresentar bom desempenho para partículas grandes, maiores que 250nm, no que tange à coleta de vírus, seu desempenho não é tão satisfatório. Os vírus possuem tamanhos que variam entre 20nm e 400nm, aproximadamente. O coronavírus possui tamanhos que variam entre 60nm e 140nm, com uma média de tamanho de 100nm, ou seja, é classificado como uma MPPS, e como visto, para esta faixa de tamanho o filtro não é eficiente [138]. Por outro lado, é importante ressaltar que, uma gotícula expelida pelo ser humano apresenta um tamanho aproximado de 10 μm , e seu interior pode conter centenas de vírus e outros microrganismos. Neste caso, o filtro aqui analisado pode ser efetivo na sua retenção. Já as bactérias podem apresentar dimensões compreendidas entre 0,2 μm e 25 μm . As espécies de maior importância médica medem cerca de 0,2-1,5 μm em diâmetro e de 3-5 μm em comprimento [139,140]. Neste caso, considerando a

tendência de maiores eficiências de coleta para partículas de dimensões superiores à 240nm (vide Figura 4.13), é possível que o filtro resultante deste trabalho possa apresentar alta eficiência para estes microrganismos.

Para melhorar o desempenho destes filtros para a coleta de bioaerossóis em geral, seria necessário aumentar a espessura deste filtro, podendo aumentar a quantidade de camadas de fibras. Uma membrana de nanofibras depositada na superfície do filtro também seria uma alternativa, uma vez que menores diâmetros de fibras aumentam a eficiência de coleta. A eficiência de filtração tende a aumentar com a deposição de camadas de fibras e/ou com a redução dos tamanhos dos poros, e esta é diretamente relacionada com a queda de pressão. Zhang et al. (2010) [137] avaliaram a influência da quantidade de camadas de fibras dos filtros no seu fator de qualidade. Como resultado, mesmo apresentando um maior valor de queda de pressão, os filtros compostos por três camadas de nanofibras de PAN (poliacrilonitrila) apresentaram um fator de qualidade maior ($0,063 \text{ Pa}^{-1}$) que os filtros compostos por apenas uma camada ($0,037 \text{ Pa}^{-1}$).

Outra propriedade do filtro que afeta a eficiência de filtração é o diâmetro das fibras que o compõem. Nanofibras apresentam uma elevada área superficial, o que aumenta significativamente a probabilidade de as partículas de aerossóis se depositarem sobre elas. Podgórski e colaboradores (2006) [136] concluíram em seu estudo que fibras nanométricas resultam em filtros com eficiência de coleta significativamente maior que filtros com fibras micrométricas, e o aumento da queda de pressão é moderado. Neste sentido, diversos estudos têm trabalhado no desenvolvimento de filtros com fibras nanométricas para coleta de aerossóis, através da técnica de *electrospinning*, e muitos atingem eficiências de coleta e fatores de qualidade bem elevados [139,140].

Outra possível alternativa para melhorar o desempenho destes filtros, seria aumentar a quantidade das partículas de quitosana/própolis depositadas sobre as fibras, já que, a deposição realizada neste estudo não alterou de forma significativa as características iniciais do filtro.

As faixas de eficiências de coleta, segundo as normas ISO 16890 (*Air filters for general ventilation: Technical specifications, requirements and*

classification system based upon particulate matter efficiency) e ABNT NBR 16401-3 (Instalações de ar condicionado, Parte 3: Qualidade do ar interior [142]), específica para ar condicionados, estão apresentadas na Tabela 4.8, e correlacionadas às classificações dos meios filtrantes, segundo as normas europeias (EN 779 e EN 1822 - *High efficiency air filters EPA, HEPA and ULPA*).

A nova norma internacional ISO 16890:2016, em vigor desde 2018, foi criada para harmonizar e substituir as normas europeia (EN 779) e americana (ASHRAE 52.2) pra testes de eficiências em filtros, além de classificar os filtros, de acordo com a OMS, como material particulado (MP) [143]. Com esta nova norma, os testes de eficiência abrangem uma maior variedade de tamanho de partícula, exatamente como seria na prática, em instalações de tratamentos de ar, por exemplo. Segundo esta norma, para um filtro ser pertencente à cada classe, ele precisa apresentar eficiência mínima de 50% para aquela faixa de tamanho de partículas. De forma a exemplificar, se um filtro apresentar 91% de eficiência para MP10, 72% para MP2,5, e 60% para a fração MP1, ele será classificado como ePM1 60%, pois apresenta eficiência acima de 50% para esta faixa de tamanhos de partículas.

Como já observado na Tabela 4.7, o filtro branco apresentou uma eficiência global de 43,87%, valor que se encontra na faixa de eficiências entre $40 \leq E_m < 60$, e, portanto, pode ser classificado como um filtro M5 segundo a norma EN 779 (Tabela 4.8). Para a faixa de tamanhos de partículas analisada (entre 6nm e 240nm) não é possível classificar o filtro segundo a ISO 16890.

Isto posto, a modificação do filtro com as nanopartículas, com a finalidade de atribuir ação biocida a este, não prejudicou sua performance de filtração, pelo contrário, apresentou uma tendência a melhorar os valores de eficiência de coleta global, com pouca alteração na queda de pressão. Desta forma, a impregnação das NPs aqui estudadas pode ser estendida a outros filtros, que apresentem melhores eficiências de coleta, principalmente para as partículas mais penetrantes (MPPS), que de modo geral, englobam os vírus, bactérias e outros bioaerossóis, sem comprometer de forma significativa seu fator de qualidade.

Tabela 4.8 - Classificações para os meios filtrantes, segundo as normas NBR 16401-3 e ISO 16890.

Eficiências (%)			NBR 16401-3	ISO 16890			
			E	ePM1	ePM2,5	ePM10	Coarse
E N 7 7 9	Grosso	G1	$50 \leq E_g < 65$	-	-	-	-
		G2	$65 \leq E_g < 80$	-	-	-	-
		G3	$80 \leq E_g < 90$	-	-	-	$e > 80$
		G4	$90 \leq E_g$	-	-	-	$e > 90$
	Médio	M5	$40 \leq E_m < 60$	-	-	$e > 50$	-
		M6	$60 \leq E_m < 80$	-	$50 \leq e < 65$	$e > 60$	-
	Fino	F7	$80 \leq E_m < 90$	$50 \leq e < 65$	$65 \leq e < 80$	$e > 85$	-
		F8	$90 \leq E_m < 95$	$65 \leq e < 80$	$e > 80$	$e > 90$	-
		F9	$95 \leq E_m$	$e > 80$	$e > 95$	$e > 95$	-
E N 1 8 2 2	EPA	E10	$E_{0,3} > 85$	-	-	-	-
		E11	$E_{0,3} > 95$	-	-	-	-
		E12	$E_{0,3} > 99,5$	-	-	-	-
	HEPA	H13	$E_{0,3} > 99,95$	-	-	-	-
		H14	$E_{0,3} > 99,995$	-	-	-	-
	ULPA	U15	$E_{0,12} > 99,9995$	-	-	-	-
U16		$E_{0,12} > 99,99995$	-	-	-	-	
U17		$E_{0,12} > 99,999995$	-	-	-	-	

E_g = Eficiência gravimétrica média para partículas de 0,4 μ m de diâmetro.

E_m = Eficiência média para partículas de 0,4 μ m de diâmetro.

$E_{0,3}$ = Eficiência do filtro para partículas de 0,3 μ m de diâmetro.

$E_{0,12}$ = Eficiência do filtro para partículas de 0,12 μ m de diâmetro (MMPS).

ISO ePM1 = fração do material particulado na faixa entre 0,3 – 1 μ m.

ISO ePM2.5 = fração do material particulado na faixa entre 0,3 – 2,5 μ m.

ISO ePM10 = fração do material particulado na faixa entre 0,3 – 10 μ m.

ISO Coarse = filtros grossos com eficiência inferior a 50% para material particulado PM10.

5 CONCLUSÕES

Com base no exposto no presente trabalho, conclui-se que as nanopartículas de quitosana e própolis foram obtidas com sucesso pelo método de gelificação iônica, e se mostraram efetivas na inibição do crescimento de bactérias gram-positivas, e, apoiado nos resultados já reportados na literatura, estas formulações podem ser efetivas frente às bactérias gram-negativas e outros bioaerossóis.

As nanopartículas foram sintetizadas segundo o método de gelificação iônica, que se mostrou eficaz na incorporação da própolis na matriz de quitosana na morfologia desejada. Esta incorporação foi corroborada pelos espectros de FTIR das nanopartículas em comparação com os espectros dos constituintes individuais, e também pela avaliação das eficiências de encapsulação. Inicialmente, correlacionando as variáveis de resposta tamanho de partícula e eficiência de encapsulação das doze formulações analisadas, as amostras 3:1-1,5P (razão entre quitosana e TPP de 3:1, e 1,5mg/ml de própolis) e 4:1-1,5P (razão entre quitosana e TPP de 4:1, e 1,5mg/ml de própolis) foram pré-selecionadas, apresentando diâmetro de partículas (ou aglomerados de partículas) de $392 \pm 15\text{nm}$ e $457 \pm 17\text{nm}$ e eficiências de encapsulação de $78 \pm 0,1\%$ e $75 \pm 0,8\%$, respectivamente. Ao avaliar a morfologia destas partículas através de MEV, observou-se que, na realidade, os diâmetros fornecidos pela técnica DLS, provavelmente, correspondiam à aglomerados de partículas menores e/ou partículas inchadas pelo meio aquoso. A média de diâmetros de partículas determinada a partir das imagens de microscopia foi de $73 \pm 15\text{nm}$ para as NPs 3:1-1,5P e de $51 \pm 5\text{nm}$ para as NPs 4:1-1,5P.

Com relação à atividade antimicrobiana das nanopartículas, foram alcançadas concentrações mínimas inibitórias (MIC) de 1,25mg/ml e 2,5mg/ml para as NPs 3:1-1,5P e 4:1-1,5P, respectivamente, frente a cepa *S. aureus*. Já com relação a cepa *E. coli*, não foi determinada MICs para as concentrações avaliadas. Com a intenção de garantir uma maior performance das nanopartículas frente aos microrganismos, após serem distribuídas pelas fibras do meio filtrante, optou-se por utilizar a concentração de 10mg/ml para a

modificação do mesmo. Para esta concentração, ambos os filtros modificados apresentaram taxa de redução bacteriana acima de 97%.

A análise do filtro comercial quanto à eficiência de filtração, permeabilidade e fator de qualidade, permitiu verificar que a presença das nanopartículas nas fibras do filtro não resultou num acréscimo significativo nos valores de queda de pressão. Isto porque a concentração das suspensões e os tamanhos das NPs são ínfimos frente ao tamanho médio das fibras, e a massa total do meio filtrante. Por este mesmo motivo, as eficiências de coleta global (47% para 3:1-1,5P e 45% para 4:1-1,5P) e os fatores de qualidade ($0,0058 \text{ Pa}^{-1}$ para 3:1-1,6P e $0,0052 \text{ Pa}^{-1}$) apresentaram valores bem próximos aos obtidos pelo filtro branco (43% e $0,0055 \text{ Pa}^{-1}$). Por conseguinte, concluiu-se que a impregnação das NPs de quitosana e própolis não prejudicou a performance do filtro comercial utilizado neste estudo, e sim, atribuiu a característica antimicrobiana.

Ante o exposto, inferiu-se que a síntese de nanopartículas por gelificação iônica apresenta potencial tecnológico, por ser um método relativamente simples e escalonável, uma vez otimizado os parâmetros químicos e experimentais que controlam o processo. Além disso, a aplicação de nanopartículas de quitosana e própolis na modificação de matrizes funcionais tais como sistemas de filtração de ambientes internos, se torna uma ótima opção para conferir efeito biocida com a finalidade de conter a disseminação de microrganismos patogênicos.

Ainda no contexto da pandemia da COVID-19 e poluição atmosférica, responsável por inúmeras doenças respiratórias, o presente trabalho apresenta resultados relevantes e promissores para a sociedade como um todo. Esta modificação com NPs pode ser realizada em filtros de ar condicionado e outros sistemas de ventilação de ambientes internos como transportes públicos, hospitais, ambientes de trabalho e domésticos.

Por fim, este trabalho reforça a ideia de que a própolis, um composto ativo natural, e a quitosana, polímero também natural, podem apresentar proteção efetiva contra microrganismos patogênicos, de forma menos nociva ao meio ambiente e à saúde da população.

6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

De forma a aprimorar os resultados obtidos no presente estudo, sugere-se para trabalhos futuros:

- Otimizar os parâmetros químicos tais como pH das soluções iniciais, concentração inicial da solução de quitosana e a razão molar entre a quitosana e o TPP.
- Avaliar a estabilidade das nanopartículas e sua atividade antimicrobiana após um período maior de armazenamento.
- Quantificar o número de partículas por área do meio filtrante.
- Testar outros meios de impregnação, de forma a alcançar uma maior homogeneidade na distribuição das partículas nas fibras, bem como sua replicabilidade.
- Avaliar o efeito das nanopartículas frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli* após um período maior de exposição (superior à 24h)
- Avaliar o efeito das nanopartículas frente a outros microrganismos, como fungos, ácaros e vírus.
- Realizar os testes de filtração para maiores tamanhos de partículas (acima de 250nm), a fim de abranger a faixa de tamanhos que compreendem as bactérias.
- Aumentar a espessura do filtro, ou adicionar membranas nanofibrilares em sua superfície, com a finalidade de aumentar a eficiência de coleta do meio filtrante.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Pui, D. Y. H., Chen, S. C., & Zuo, Z., PM2.5 in China: Measurements, sources, visibility and health effects, and mitigation, *Particuology*, vol. 13, no. 1, p. 1–26, 2014, doi: 10.1016/j.partic.2013.11.001.
- [2] Jung, J. H. *et al.*, Antimicrobial air filtration using airborne *Sophora flavescens* natural-product nanoparticles, *Aerosol Sci. Technol.*, vol. 45, no. 12, p. 1510–1518, 2011, doi: 10.1080/02786826.2011.602763.
- [3] Fears, A. C. *et al.*, Comparative dynamic aerosol efficiencies of three emergent coronaviruses and the unusual persistence of SARS-CoV-2 in aerosol suspensions, *medRxiv Prepr. Serv. Heal. Sci.*, vol. 2, 2020, doi: 10.1101/2020.04.13.20063784.
- [4] Aboubakr, H. A., Sharafeldin, T. A., & Goyal, S. M., Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review, *Transbound. Emerg. Dis.*, vol. 68, no. 2, p. 296–312, 2021, doi: 10.1111/tbed.13707.
- [5] McNamara, M. L., Thornburg, J., Semmens, E. O., Ward, T. J., & Noonan, C. W., Reducing indoor air pollutants with air filtration units in wood stove homes, *Sci. Total Environ.*, vol. 592, p. 488–494, 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.111.
- [6] Komaladewi, A. A. I. A. S., Khoiruddin, K., Surata, I. W., Subagia, I. D. G. A., & Wenten, I. G., Recent advances in antimicrobial air filter, in *E3S Web of Conferences*, 2018, vol. 67, p. 1–6, doi: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20186703016>.
- [7] Jung, J. H., Hwang, G. B., Lee, J. E., & Bae, G. N., Preparation of Airborne Ag / CNT Hybrid Nanoparticles Using an Aerosol Process and Their Application to Antimicrobial Air Filtration, *Langmuir*, vol. 27, p. 10256–10264, 2011, doi: [dx.doi.org/10.1021/la201851r](https://doi.org/10.1021/la201851r).
- [8] Benhanifia, M., Mohamed, W. M., Bellik, Y., & Benbarek, H., Antimicrobial and antioxidant activities of different propolis samples from north-western

- Algeria, *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 48, no. 12, p. 2521–2527, 2013, doi: 10.1111/ijfs.12244.
- [9] Natrajan, D., Srinivasan, S., Sundar, K., & Ravindran, A., Formulation of essential oil-loaded chitosan e alginate nanocapsules, *J. Food Drug Anal.*, p. 1–9, 2015, doi: 10.1016/j.jfda.2015.01.001.
- [10] Hu, X., Wang, Y., & Peng, B., Chitosan-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles as pH-Responsive Nanocarriers for Controlled Drug Release, *Chem. Asian J.*, vol. 9, p. 319–327, 2014, doi: 10.1002/asia.201301105.
- [11] Ahmadi, Z., Saber, M., Akbari, A., & Mahdavinia, G. R., Encapsulation of *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) in chitosan/TPP nanoparticles with enhanced acaricide activity against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 161, no. September 2017, p. 111–119, 2018, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.05.051.
- [12] Patil, P., Chavanke, D., & Wagh, M., A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive galispheres, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 4, 2012.
- [13] Finlayson-Pitts, B. J. & Pitts, J. N., Particles in the Troposphere, *Chem. Up. Low. Atmos.*, p. 349–435, 2000, doi: 10.1016/b978-012257060-5/50011-3.
- [14] O'Dowd, C. D., Aalto, P., Hämeri, K., Kulmala, M., & Hoffmann, T., Atmospheric particles from organic vapours, *Nature*, vol. 416, no. 6880, p. 497–498, 2002, doi: 10.1038/416497a.
- [15] Amador, I. R., Pinto, J. P., & Solci, M. C., Concentration and Size Distribution of Particulate Matter in a Broiler House Ambient Air, *Orbital - Electron. J. Chem.*, vol. 8, no. 3, 2016, doi: 10.17807/orbital.v8i3.847.
- [16] Stetzenbach, L. D., Airborne Infectious Microorganisms, *Pathogenesis*, p. 175–182, 2009.
- [17] Fischer, P. H. *et al.*, Traffic-related differences in outdoor and indoor

- concentrations of particles and volatile organic compounds in Amsterdam, *Atmos. Environ.*, vol. 34, no. 22, p. 3713–3722, 2000, doi: 10.1016/S1352-2310(00)00067-4.
- [18] Li, Z., Wen, Q., & Zhang, R., Sources, health effects and control strategies of indoor fine particulate matter (PM_{2.5}): A review, *Sci. Total Environ.*, vol. 586, p. 610–622, 2017, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.029.
- [19] Siegel, J. A., Primary and secondary consequences of indoor air cleaners, *Indoor Air*, vol. 26, no. 1, p. 88–96, 2016, doi: 10.1111/ina.12194.
- [20] Lv, S. *et al.*, Preparation and properties of sc-PLA/PMMA transparent nanofiber air filter, *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 9, p. 1–11, 2018, doi: 10.3390/polym10090996.
- [21] Zhu, M. *et al.*, Electrospun Nanofibers Membranes for Effective Air Filtration, *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 302, no. 1, p. 1–27, 2017, doi: 10.1002/mame.201600353.
- [22] Purchas, D. B. & Sutherland, K., Handbook of Filter Media, in *Elsevier Science*, 2nd ed., Elsevier Science, 2002, p. 1–34.
- [23] Dunnett, S. J. & Clement, C. F., A numerical study of the effects of loading from diffusive deposition on the efficiency of fibrous filters, *J. Aerosol Sci.*, vol. 37, no. 9, p. 1116–1139, 2006, doi: 10.1016/j.jaerosci.2005.08.001.
- [24] Innocentini, M. D. M., Romano, R. C. O., Schreurs, H., Rodrigues, V. P., Coury, J. R., & Pileggi, R. G., Avaliação da permeabilidade de filtros de aerossóis para altas temperaturas, preparados a partir da técnica de adição de espuma aquosa em suspensão cerâmica, *Cerâmica*, vol. 55, no. 336, p. 437–447, 2009, doi: 10.1590/s0366-69132009000400015.
- [25] Colbeck, I. & Lazaridis, M., *Aerosol Science - Technology and Applications*. John Wiley & Sons Ltd, 2014.
- [26] Cooper, C. D. & Alley, F. C., *Air Pollution Control: A Design Approach*, 4th ed. Waveland Press Inc, 2011.

- [27] Wilcox, M., Kurz, R., & Brun, K., Technology review of modern gas turbine inlet filtration systems, *Int. J. Rotating Mach.*, vol. 2012, 2012, doi: 10.1155/2012/128134.
- [28] Innocentini, M. D. M. & Pandolfelli, V. C., Considerações sobre a estimativa da permeabilidade em concretos refratários através das equações de Darcy e de Forchheimer, *Cerâmica*, vol. 45, no. 292–293, p. 61–67, 1999, doi: 10.1590/s0366-69131999000200003.
- [29] Bortolassi, A. C. C. *et al.*, Composites based on nanoparticle and PAN electrospun nanofiber membranes for air filtration and bacterial removal, *Nanomaterials*, vol. 9, no. 12, 2019, doi: 10.3390/nano9121740.
- [30] Detsri, E., Kamhom, K., & Ruen-ngam, D., Layer-by-layer deposition of green synthesised silver nanoparticles on polyester air filters and its antimicrobial activity, *J. Exp. Nanosci.*, vol. 11, no. 12, p. 930–939, 2016, doi: 10.1080/17458080.2016.1181277.
- [31] Tremiliosi, G. C. *et al.*, Ag nanoparticles-based antimicrobial polycotton fabrics to prevent the transmission and spread of SARS-CoV-2, *bioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.06.26.152520.
- [32] Ramyadevi, J., Jeyasubramanian, K., Marikani, A., Rajakumar, G., & Rahuman, A. A., Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles, *Mater. Lett.*, vol. 71, p. 114–116, 2012, doi: 10.1016/j.matlet.2011.12.055.
- [33] Chaudhary, J., Tailor, G., Kumar, D., & Joshi, A., Synthesis and Thermal Properties of Copper Nanoparticles, *Asian J. Chem.*, vol. 29, no. 8, p. 1757–1760, 2017.
- [34] Machry, K., Souza, C. W. O., Aguiar, M. L., & Bernardo, A., Prevention of pathogen microorganisms at indoor air ventilation system using synthesized copper nanoparticles, *Can. J. Chem. Eng.*, no. December 2020, p. 1–8, 2021, doi: 10.1002/cjce.24272.

- [35] Araújo, I. M. S. *et al.*, Hydrothermal synthesis of bacterial cellulose–copper oxide nanocomposites and evaluation of their antimicrobial activity, *Carbohydr. Polym.*, vol. 179, no. May 2017, p. 341–349, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.09.081.
- [36] Gudkov, S. V, Burmistrov, D. E., Serov, D. A., & Rebezov, M. B., A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles, *Front. Phys.*, vol. 9, p. 1–12, 2021, doi: 10.3389/fphy.2021.641481.
- [37] Gutierrez, J., Tercjak, A., Algar, I., Retegi, A., & Mondragon, I., Conductive properties of TiO₂/bacterial cellulose hybrid fibres, *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 377, no. 1, p. 88–93, 2012, doi: 10.1016/j.jcis.2012.03.075.
- [38] Bai, Y. *et al.*, Aqueous dispersion of surfactant-modified multiwalled carbon nanotubes and their application as an antibacterial agent, *Carbon N. Y.*, vol. 49, no. 11, p. 3663–3671, 2011, doi: 10.1016/j.carbon.2011.05.002.
- [39] Rosa, P. de F., Aguiar, M. L., & Bernardo, A., Modification of Cotton Fabrics with Silver Nanoparticles for Use in Conditioner Air to Minimize the Bioaerosol Concentration in Indoor Environments, *Water Air Soil Pollut.*, vol. 228, no. 7, p. 244, 2017, doi: 10.1007/s11270-017-3429-y.
- [40] Gupta, A., Mishra, V., & Srivastava, R., Zinc oxide nanoparticles decorated fluorescent and antibacterial glass fiber pre-filter paper, *Nano Express*, vol. 1, no. 1, 2020, doi: 10.1088/2632-959X/ab976d.
- [41] Panyala, N. R., Peña-Méndez, E. M., & Havel, J., Silver or silver nanoparticles: A hazardous threat to the environment and human health?, *J. Appl. Biomed.*, vol. 6, no. 3, p. 117–129, 2008, doi: 10.32725/jab.2008.015.
- [42] Karlsson, H. L., Cronholm, P., Gustafsson, J., & Möller, L., Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes, *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 21, no. 9, p. 1726–1732, 2008, doi: 10.1021/tx800064j.

- [43] Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. J., Antimicrobial activity of flavonoids, *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 26, no. 5, p. 343–356, 2005, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002.
- [44] Deng, W. *et al.*, Masks for COVID-19, *Adv. Sci.*, vol. 9, no. 3, p. 1–30, 2022, doi: 10.1002/advs.202102189.
- [45] Hwang, G. B. *et al.*, Antimicrobial air filters using natural *Euscaphis japonica* nanoparticles, *PLOS ONE ONE*, vol. 10, no. 5, p. 1–14, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0126481.
- [46] Huang, R., Pyankov, O. V., Yu, B., & Agranovski, I. E., Inactivation of fungal spores collected on fibrous filters by *melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil), *Aerosol Sci. Technol.*, vol. 44, no. 4, p. 262–268, 2010, doi: 10.1080/02786820903580188.
- [47] Chong, E. *et al.*, Science of the Total Environment Antimicrobial durability of air filters coated with airborne *Sophora fl avescens* nanoparticles, *Sci. Total Environ.*, vol. 444, p. 110–114, 2012, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.075.
- [48] Han, B., Kang, J., Kim, H., Woo, C., & Kim, Y., Investigation of Antimicrobial Activity of Grapefruit Seed Extract and Its Application to Air Filters with Comparison to Propolis and Shiitake, *Aerosol Air Qual. Res.*, vol. 15, p. 1035–1044, 2015, doi: 10.4209/aaqr.2014.09.0208.
- [49] Gilling, D. H., Ravishankar, S., & Bright, K. R., Antimicrobial efficacy of plant essential oils and extracts against *Escherichia coli*, *J. Environ. Sci. Heal. Part A*, vol. 0, no. 0, p. 1–9, 2019, doi: 10.1080/10934529.2019.1574153.
- [50] Jeong, S. Bin, Heo, K. J., & Lee, B. U., Antimicrobial Air Filters Using Natural Sea Salt Particles for Deactivating Airborne Bacterial Particles, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 17, 2020.
- [51] Jung, J. H., Lee, J. E., & Bae, G., Use of electrosprayed *Sophora*

- flavescens natural-product nanoparticles for antimicrobial air filtration, *J. Aerosol Sci.*, vol. 57, p. 185–193, 2013, doi: 10.1016/j.jaerosci.2012.09.004.
- [52] Byun, H. R. *et al.*, Antimicrobial Air Filter Coating with Plant Extracts Against Airborne Microbes, *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 9120, p. 1–14, 2020, doi: doi:10.3390/app10249120.
- [53] Salussoglia, A. I. P., de Souza, C. W. O., Tanabe, E. H., & Lopes Aguiar, M., Evaluation of filter media covered with spun fibres and containing thyme essential oil with antimicrobial properties, *Environ. Technol. (United Kingdom)*, vol. 43, no. 2, p. 301–310, 2022, doi: 10.1080/09593330.2020.1786167.
- [54] Auffan, M., Rose, J., Bottero, J., Lowry, G. V, Jolivet, J., & Wiesner, M. R., Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, *Nat. Nanotechnol.*, vol. 4, no. 10, p. 634–641, 2009, doi: 10.1038/nnano.2009.242.
- [55] George, A., Shah, P. A., & Shrivastav, P. S., Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review, *Int. J. Pharm.*, vol. 561, no. March, p. 244–264, 2019, doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.011.
- [56] Grabnar, P. A. & Kristl, J., The manufacturing techniques of drug-loaded polymeric nanoparticles from preformed polymers, *J. Microencapsul.*, vol. 28, no. 4, p. 323–335, 2011, doi: 10.3109/02652048.2011.569763.
- [57] Zhuang, J., Fang, R. H., & Zhang, L., Preparation of Particulate Polymeric Therapeutics for Medical Applications, *Small Methods*, vol. 1700147, p. 1–16, 2017, doi: 10.1002/smt.201700147.
- [58] Hu, L., Sun, Y., & Wu, Y., Advances in chitosan-based drug delivery vehicles, *Nanoscale*, vol. 5, p. 3103–3111, 2013, doi: 10.1039/c3nr00338h.
- [59] Dutta, P. K., Dutta, J., & Tripathi, V. S., Chitin and chitosan: Chemistry,

- properties and applications, *J. Sci. Ind. Res.*, vol. 63, p. 20–31, 2004, doi: 10.1016/B978-0-12-817970-3.00001-8.
- [60] Azevedo, V. V. C., Chaves, S. a, Bezerra, D. C., Fook, M. V. L., & Costa, a C. F. M., Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais, *Rev. Eletrônica Mater. e Process.*, vol. 2.3, p. 27–34, 2007.
- [61] Gan, Q. & Wang, T., Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier- Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 59, no. 1, p. 24–34, 2007, doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.04.009.
- [62] Koukaras, E. N., Papadimitriou, S. A., Bikiaris, D. N., & Froudakis, G. E., Insight on the formation of chitosan nanoparticles through ionotropic gelation with tripolyphosphate, *Mol. Pharm.*, vol. 9, no. 10, p. 2856–2862, 2012, doi: 10.1021/mp300162j.
- [63] Fatullayeva, S., Tagiyev, D., Zeynalov, N., Mammadova, S., & Aliyeva, E., Recent advances of chitosan-based polymers in biomedical applications and environmental protection, *J. Polym. Res.*, vol. 29, no. 7, 2022, doi: 10.1007/s10965-022-03121-3.
- [64] Kumar, S., Ye, F., Dobretsov, S., & Dutta, J., Chitosan nanocomposite coatings for food, paints, and water treatment applications, *Appl. Sci.*, vol. 9, no. 12, 2019, doi: 10.3390/app9122409.
- [65] El Knidri, H., Belaabed, R., Addaou, A., Laajeb, A., & Lahsini, A., Extraction, chemical modification and characterization of chitin and chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 120, p. 1181–1189, 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.139.
- [66] Nunes, I. dos S., Medeiros, J. A. da C., Stamford, N. P., Stamford, T. L. M., & Stamford, T. C. M., Nanopartículas de quitosana: Técnicas de obtenção e aplicações na indústria de alimentos, in *Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 4*, 2021, p. 345–369.

- [67] Desai, K. G. H., Chitosan nanoparticles prepared by ionotropic gelation: An overview of recent advances, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, vol. 33, no. 2, p. 107–158, 2016, doi: 10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2016014850.
- [68] Sahariah, P., Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives : A Review of the Structure – Activity Relationship, p. 3846–3868, 2017, doi: 10.1021/acs.biomac.7b01058.
- [69] Aranaz, I. *et al.*, Chitosan: An overview of its properties and applications, *Polymers (Basel)*., vol. 13, no. 19, 2021, doi: 10.3390/polym13193256.
- [70] Guarnieri, A. *et al.*, Antimicrobial properties of chitosan from different developmental stages of the bioconverter insect *Hermetia illucens*, *Sci. Rep.*, vol. 12, p. 1–12, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-12150-3.
- [71] Desai, K. G. H., Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionotropic Gelation : An Overview of Recent Advances, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.*, vol. 33, no. 2, p. 107–158, 2016.
- [72] Allan, C. R. & Hadwiger, L. A., The Fungicidal Effect of Chitosan on Fungi of Varying Cell Wall Composition, *Exp. Mycol.*, vol. 3, p. 285–287, 1979.
- [73] Zou, P. *et al.*, Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides, *Food Chem.*, vol. 190, no. 12, p. 1174–1181, 2016, doi: 10.1016/j.foodchem.2015.06.076.
- [74] Confederat, L. G., Tuchilus, C. G., Dragan, M., Sha, M., & Dragostin, O. M., Preparation and Antimicrobial Activity of Chitosan and Its Derivatives : A Concise Review, *Molecules*, vol. 26, 2021, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26123694>.
- [75] Raafat, D., Barga, K. Von, Haas, A., & Sahl, H., Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound, *Appl. Environmental Microbiol.*, vol. 74, no. 12, p. 3764–3773, 2008, doi: 10.1128/AEM.00453-08.

- [76] Liu, X. F. E. I., Guan, Y. U. N. L. I. N., Yang, D. Z. H. I., Li, Z. H. I., & Yao, K. D. E., Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 79, p. 1324–1335, 2001.
- [77] Goy, R. C., Britto, D. De, & Assis, O. B. G., A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan, *Polímeros Ciência e Tecnol.*, vol. 19, p. 241–247, 2009.
- [78] Kravanja, G., Primožič, M., Knez, Ž., & Leitgeb, M., Chitosan-Based (Nano)Materials for Novel Biomedical Applications, *Molecules*, vol. 24, no. 1960, p. 1–23, 2019, doi: 10.3390/molecules24101960.
- [79] Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J., Novel Hydrophilic Chitosan – Polyethylene Oxide Nanoparticles as Protein Carriers, *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 63, p. 125–132, 1997.
- [80] de Carvalho, F. G. *et al.*, Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, no. October 2018, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109885.
- [81] Khoerunnisa, F. *et al.*, Physicochemical Properties of TPP-Crosslinked Chitosan Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents, *Fibers Polym.*, vol. 22, no. 11, p. 2954–2964, 2021, doi: 10.1007/s12221-021-0397-z.
- [82] Duse, L. *et al.*, Preparation and Characterization of Curcumin Loaded Chitosan Nanoparticles for Photodynamic Therapy, *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.*, vol. 215, no. 15, p. 1–5, 2018, doi: 10.1002/pssa.201700709.
- [83] Yadav, P. & Yadav, A. B., Preparation and characterization of BSA as a model protein loaded chitosan nanoparticles for the development of protein-/peptide-based drug delivery system, *Futur. J. Pharm. Sci.*, vol. 7, no. 200, p. 1–9, 2021, doi: 10.1186/s43094-021-00345-w.
- [84] do Nascimento, T. G. *et al.*, Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red

- Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity, *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 11, no. 1, 2016, doi: 10.1186/s11671-016-1517-3.
- [85] de Oliveira Barud, H. G. *et al.*, A multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: Bacterial cellulose, *Carbohydr. Polym.*, vol. 153, p. 406–420, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.07.059.
- [86] Woo, C. G. *et al.*, Treatment of Air Filters Using the Antimicrobial Natural Products Propolis and Grapefruit Seed Extract for Deactivation of Bioaerosols, *Aerosol Sci. Technol.*, vol. 49, p. 611–619, 2015, doi: 10.1080/02786826.2015.1054983.
- [87] Lustosa, S. R., Galindo, A. B., Nunes, L. C. C., Randau, K. P., & Rolim Neto, P. J., Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia, *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 18, no. 3, p. 447–454, 2008, doi: 10.1590/s0102-695x2008000300020.
- [88] Paulo, F., Paula, V., Estevinho, L. M., & Santos, L., Propolis microencapsulation by double emulsion solvent evaporation approach: Comparison of different polymeric matrices and extract to polymer ratio, *Food Bioprod. Process.*, vol. 127, p. 408–425, 2021, doi: 10.1016/j.fbp.2021.03.019.
- [89] Março, P. H. & Poppi, R. J., Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais, *Quim. Nova*, vol. 31, no. 5, p. 1218–1223, 2008, doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500051>.
- [90] Mocanu, A., Isopencu, G., Busuioc, C., Popa, O. M., Dietrich, P., & Socaciu-Siebert, L., Bacterial cellulose films with ZnO nanoparticles and propolis extracts: Synergistic antimicrobial effect, *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 1–10, 2019, doi: 10.1038/s41598-019-54118-w.
- [91] Sharaf, S., Higazy, A., & Hebeish, A., Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol.

- 59, p. 408–416, 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.030.
- [92] Baysan, U. *et al.*, The effect of coating material combination and encapsulation method on propolis powder properties, *Powder Technol.*, vol. 384, p. 332–341, 2021, doi: 10.1016/j.powtec.2021.02.018.
- [93] Ong, T. H. *et al.*, Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms, *PLoS One*, vol. 12, no. 3, p. 1–22, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0174888.
- [94] Woisky, R. G. & Salatino, A., Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control, *J. Apic. Res.*, vol. 37, no. 2, p. 99–105, 1998, doi: 10.1080/00218839.1998.11100961.
- [95] Bag, G. C., Devi, P. G., & Bhaigyabati, T., Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, vol. 30, no. 28, p. 154–159, 2015.
- [96] Marcucci, M. C., Salatino, A., De Magalhães Oliveira, L. F. A., & Gonçalves, C. P., Metodologias Acessíveis para a Quantificação de Flavonoides e Fenóis Totais em Própolis, *Rev. Virtual Quim.*, vol. 13, no. 1, p. 61–73, 2021, doi: 10.21577/1984-6835.20200131.
- [97] Marques, G. S. *et al.*, Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* link, *Quim. Nova*, vol. 35, no. 3, p. 517–522, 2012, doi: 10.1590/S0100-40422012000300014.
- [98] Smith, B. C., *The Infrared Spectra of Polymers, Part I: Introduction*, *Spectroscopy*, vol. 36, no. 7, p. 17–22, 2021.
- [99] Bauer, A. W., Kirby, M., Sherris, J. C., & Turck, M., Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method, *Tha Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 45, no. 4, p. 493–496, 1966, doi: 10.1308/rcsann.2013.95.7.532.
- [100] Andrews, J. M., Determination of minimum inhibitory concentrations, *J.*

- Antimicrob. Chemother.*, vol. 48, no. Suppl.S1, p. 5–16, 2001, doi: https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- [101] Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., García-Fernandez, C., Carballo, J., & Capita, R., Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for Twelve Antimicrobials (Biocides and Antibiotics) in Eight Strains of *Listeria monocytogenes*, *Biology (Basel)*., vol. 11, no. 46, 2022, doi: <https://doi.org/10.3390/biology11010046>.
- [102] Bortolassi, A. C. C. *et al.*, Efficient nanoparticles removal and bactericidal action of electrospun nanofibers membranes for air filtration, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 102, no. April, p. 718–729, 2019, doi: [10.1016/j.msec.2019.04.094](https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.04.094).
- [103] Araújo, D. T., Vieira, G. J. L., Figueiredo, A. C. C., & Farias, A. F. F., Importância da técnica de dispersão de luz dinâmica para a determinação de tamanho de partícula, 2019.
- [104] Bhattacharjee, S., Review article DLS and zeta potential – What they are and what they are not ?, *J. Control. Release*, vol. 235, p. 337–351, 2016, doi: [10.1016/j.jconrel.2016.06.017](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017).
- [105] Kamble, S., Agrawal, S., Cherumukkil, S., Sharma, V., Jasra, R. V., & Munshi, P., Revisiting Zeta Potential, the Key Feature of Interfacial Phenomena, with Applications and Recent Advancements, *ChemistrySelect*, vol. 7, no. 1, 2022, doi: [10.1002/slct.202103084](https://doi.org/10.1002/slct.202103084).
- [106] Pan, C., Qian, J., Zhao, C., Yang, H., Zhao, X., & Guo, H., Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles, *Carbohydr. Polym.*, vol. 241, no. February, p. 116349, 2020, doi: [10.1016/j.carbpol.2020.116349](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116349).
- [107] Silva, I. S. de M. *et al.*, Encapsulation of Red Propolis in Polymer Nanoparticles for the Destruction of Pathogenic Biofilms, *AAPS PharmSciTech*, vol. 21, no. 49, p. 1–9, 2020, doi: [10.1208/s12249-019-1576-8](https://doi.org/10.1208/s12249-019-1576-8).

- [108] Ong, T. H. *et al.*, Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms, *PLoS One*, vol. 12, no. 3, p. 1–22, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0174888.
- [109] Sipoli, C. C., Santana, N., Shimojo, A. A. M., Azzoni, A., & de la Torre, L. G., Scalable production of highly concentrated chitosan/TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency, *Biochem. Eng. J.*, vol. 94, p. 65–73, 2015, doi: 10.1016/j.bej.2014.11.008.
- [110] Rázga, F., Vnuková, D., Némethová, V., Mazancová, P., & Lacík, I., Preparation of chitosan-TPP sub-micron particles: Critical evaluation and derived recommendations, *Carbohydr. Polym.*, vol. 151, p. 488–499, 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2016.05.092.
- [111] Bugnicourt, L., Alcouffe, P., & Ladavière, C., Elaboration of chitosan nanoparticles: Favorable impact of a mild thermal treatment to obtain finely divided, spherical, and colloidally stable objects, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 457, no. 1, p. 476–486, 2014, doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.06.029.
- [112] Gierszewska-Drużyńska, M., Ostrowska-Czubenko, J., & Kwiatkowska, A., Effect of ionic crosslinking on density of hydrogel chitosan membranes, *Prog. Chem. Appl. Chitin its Deriv.*, vol. 18, no. December, p. 49–58, 2013.
- [113] Qun, G. & Ajun, W., Effects of molecular weight, degree of acetylation and ionic strength on surface tension of chitosan in dilute solution, *Carbohydr. Polym.*, vol. 64, no. 1, p. 29–36, 2006, doi: 10.1016/j.carbpol.2005.10.026.
- [114] Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., & Cesàro, A., Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability, *Int. J. Pharm.*, vol. 455, no. 1–2, p. 219–228, 2013, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.07.034.
- [115] Zhang, H. *et al.*, Enhanced antioxidant activity and in vitro release of propolis by acid- induced aggregation using heat-denatured zein and carboxymethyl chitosan, *Food Hydrocoll.*, vol. 81, p. 104–112, 2018, doi: 10.1016/j.foodhyd.2018.02.019.

- [116] do Nascimento, T. G. *et al.*, Modified release microcapsules loaded with red propolis extract obtained by spray-dryer technique: Phytochemical, thermal and physicochemical characterizations, *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 138, no. 5, p. 3559–3569, 2019, doi: 10.1007/s10973-019-08287-5.
- [117] Patil, S., Desai, N., Mahadik, K., & Paradkar, A., Can green synthesized propolis loaded silver nanoparticulate gel enhance wound healing caused by burns?, *Eur. J. Integr. Med.*, vol. 7, no. 3, p. 243–250, 2015, doi: 10.1016/j.eujim.2015.03.002.
- [118] Oliveira, R. N. *et al.*, FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing, *Rev. Mater.*, vol. 21, no. 3, p. 767–779, 2016, doi: 10.1590/S1517-707620160003.0072.
- [119] Sobreira, T. G. P., da Silva, L. A., de Menezes, F. D., França, E. J., & Aquino, K. A. da S., Aspectos estruturais de esferas de quitosana/PVA reticuladas com glutaraldeído submetidas a diferentes tratamentos térmicos, *Quim. Nova*, vol. 43, no. 9, p. 1251–1257, 2020, doi: 10.21577/0100-4042.20170613.
- [120] Pan, C., Qian, J., Zhao, C., Yang, H., Zhao, X., & Guo, H., Study on the relationship between crosslinking degree and properties of TPP crosslinked chitosan nanoparticles, *Carbohydr. Polym.*, vol. 241, 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116349.
- [121] Yang, W., Fu, J., Wang, T., & He, N., Chitosan/sodium tripolyphosphate nanoparticles: Preparation, characterization and application as drug carrier, *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 5, no. 5, p. 591–595, 2009, doi: 10.1166/jbn.2009.1067.
- [122] Li, J. *et al.*, Preparation of biocompatible chitosan grafted poly(lactic acid) nanoparticles, *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, no. 3, p. 221–227, 2012, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2012.05.011.
- [123] Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W., & Zhong, F.,

- Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 465, p. 137–146, 2015, doi: 10.1016/j.colsurfa.2014.10.040.
- [124] de Carvalho, F. G. *et al.*, Synthesis and characterization of TPP/chitosan nanoparticles: Colloidal mechanism of reaction and antifungal effect on *C. albicans* biofilm formation, *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 104, 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109885.
- [125] Abdullah, N. A. *et al.*, Physicochemical analyses, antioxidant, antibacterial, and toxicity of propolis particles produced by stingless bee *Heterotrigona itama* found in Brunei Darussalam, *Heliyon*, vol. 5, no. 9, p. e02476, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02476.
- [126] Divya, K., Vijayan, S., George, T. K., & Jisha, M. S., Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity, *Fibers Polym.*, vol. 18, no. 2, p. 221–230, 2017, doi: 10.1007/s12221-017-6690-1.
- [127] Mascheroni, E. *et al.*, An alternative encapsulation approach for production of active chitosan–propolis beads, *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 49, p. 1401–1407, 2014, doi: 10.1111/ijfs.12442.
- [128] Pereira, K. J. G., Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de quitosana/PLA contendo própolis para aplicações biomédicas, Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2020.
- [129] Nori, M. P., Favaro-Trindade, C. S., Matias de Alencar, S., Thomazini, M., Balieiro, J. C. de C., & Castillo, C. J. C., Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation, *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 44, no. 2, p. 429–435, 2011, doi: 10.1016/j.lwt.2010.09.010.
- [130] Ma, Z., Garrido-Maestu, A., & Jeong, K. C., Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review, *Carbohydr. Polym.*, vol. 176, p. 257–265,

- 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.08.082.
- [131] Al-saggaf, M. S., Formulation of Insect Chitosan Stabilized Silver Nanoparticles with Propolis Extract as Potent Antimicrobial and Wound Healing Composites, *Int. J. Polym. Sci.*, p. 9, 2021, doi: <https://doi.org/10.1155/2021/5578032> Research.
- [132] El-Sheikh, S. M. A., El-Alim, A. E.-A. F. A., Ibrahim, H. A. E.-F., Mobarez, E. A., El-Masry, D. M. A., & El-Sayed, W. A., Preparation, Characterization and Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticle and Chitosan-propolis Nanocomposite, *Adv. Anim. Vet. Sci.*, vol. 7, no. 2, p. 183–190, 2019, doi: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.s2.183.190> ISSN.
- [133] Lozano, C. & Torres, C., Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos, *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, vol. 35, no. Supl 1, p. 2–8, 2017, doi: 10.1016/S0213-005X(17)30028-9.
- [134] De Barros, P. M., Cirqueira, S. S. R., & Aguiar, M. L., Evaluation of the deposition of nanoparticles in fibrous filter, *Mater. Sci. Forum*, vol. 802, p. 174–179, 2014, doi: 10.4028/www.scientific.net/MSF.802.174.
- [135] Souzandeh, H., Wang, Y., Netravali, A. N., & Zhong, W., Towards Sustainable and Multifunctional Air- Filters : A Review on Biopolymer-Based Filtration Materials Towards Sustainable and Multifunctional Air-Filters :, *Polym. Rev.*, vol. 0, no. 0, p. 1–36, 2019, doi: 10.1080/15583724.2019.1599391.
- [136] Podgórski, A., Bałazy, A., & Gradón, L., Application of nanofibers to improve the filtration efficiency of the most penetrating aerosol particles in fibrous filters, *Chem. Eng. Sci.*, vol. 61, p. 6804–6815, 2006, doi: 10.1016/j.ces.2006.07.022.
- [137] Zhang, Q., Welch, J., Park, H., Wu, C., Sigmund, W., & Marijnissen, J. C. M., Improvement in nanofiber filtration by multiple thin layers of nanofiber mats, *J. Aerosol Sci.*, vol. 41, no. 2, p. 230–236, 2010, doi: 10.1016/j.jaerosci.2009.10.001.

- [138] Bonfim, D. P. F., Cruz, F. G. S., Bretas, R. E. S., Guerra, V. G., & Aguiar, M. L., A sustainable recycling alternative: Electrospun pet-membranes for air nanofiltration, *Polymers (Basel)*., vol. 13, no. 7, p. 1–14, 2021, doi: 10.3390/polym13071166.
- [139] Schulz, H. N. & Jorgensen, B. B., Big bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 55, p. 105–137, 2001, doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.105>.
- [140] Nogueira, J. M. da R. & Miguel, L. de F. S., Bacteriologia, in *Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde - Volume 4*, Rio de Janeiro: IOC, 2009, p. 221–397.
- [141] Al-Attabi, R., Dumée, L. F., Schütz, J. A., & Morsi, Y., Pore engineering towards highly efficient electrospun nanofibrous membranes for aerosol particle removal, *Sci. Total Environ.*, vol. 625, p. 706–715, 2018, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.12.342.
- [142] Associação Brasileira de Normas Técnicas, A., NBR 16401-3: Instalações de ar-condicionado - Sistemas centrais e unitários - Parte 3: Qualidade do ar interior, Rio de Janeiro, 2008. doi: ISBN 978-85-07-00891-0.
- [143] Technik, T., ISO 16890: The new standard for coarse dust and fine dust filters, Germany, 2017.

ANEXO A

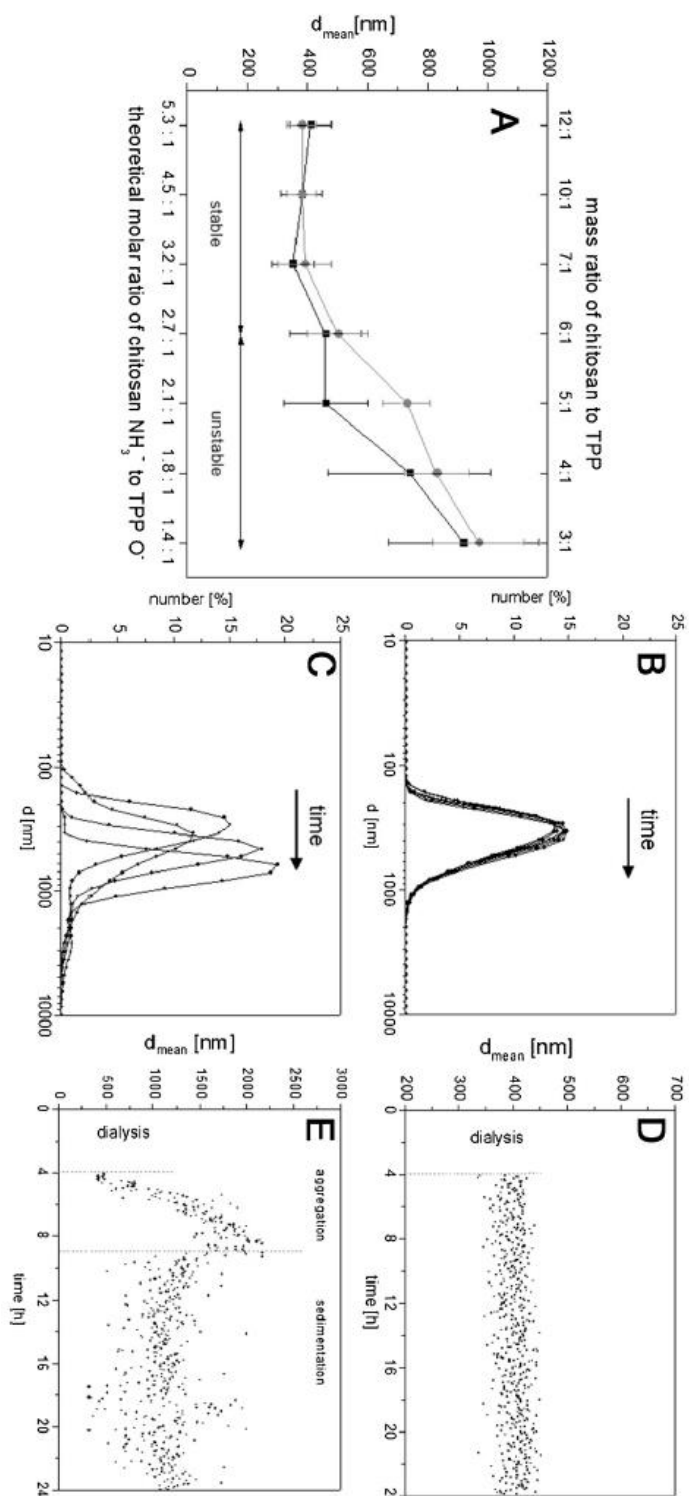


Figura A.1 - (A) Impacto da razão molar entre NH_3^+ e O^- no tamanho e estabilidade coloidal das partículas durante 24 horas. (B-E) Esquemas representativos do monitoramento de alta frequência da estabilidade coloidal de

sistemas estáveis e instáveis, representados pelas razões molares de 4.5:1 (B e D) e 1.4:1 (C e E), respectivamente.

APÊNDICE A

Neste apêndice é apresentada a curva de calibração utilizada para determinar o teor de flavonóides totais da própolis.

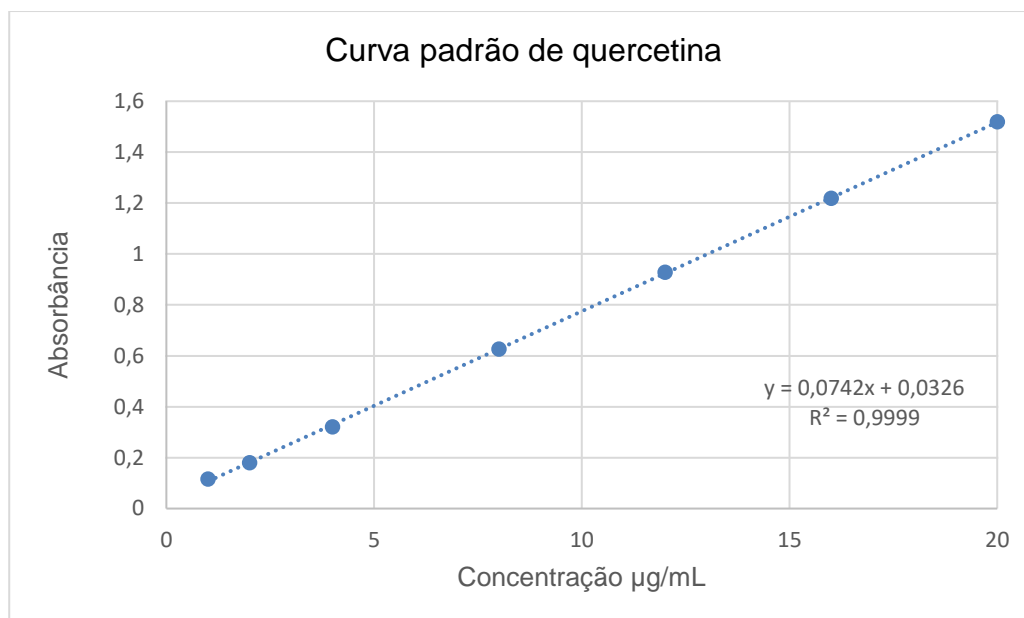


Figura A.1 - Curva padrão de quercetina

APÊNDICE B

Cálculo da razão molar entre os grupos NH_3^+ da quitosana e O^- do TPP

Razão mássica QUI:TPP = 4:1

$$M_v(\text{qui}) = 336.000 \text{ g/mol}$$

$$c(\text{qui}) = 5 \text{ mg/mL}$$

$$V(\text{solução de qui}) = 50 \text{ mL}$$

$$m_s(\text{qui}) = 0,25 \text{ g}$$

$$\text{GD} = 71\%$$

$$M(\text{TPP}) = 367.86 \text{ g/mol}$$

$$c(\text{TPP}) = 5 \text{ mg/mL}$$

$$V(\text{solução de TPP}) = 12.5 \text{ mL}$$

$$m_s(\text{TPP}) = 0.0625 \text{ g}$$

$$x(\text{TPP}) = 5$$

$$\text{GD} = \frac{x}{x+y}, \text{ sendo } x = \text{número de mols desacetilado}$$

$$y = \text{número de mols total}$$

$$0,71 = \frac{x}{x+y} \Rightarrow x = 2.44y$$

$$M_v(\text{qui}) = M_d \cdot x + M_a \cdot y, \text{ sendo } M_d = 179.17 \text{ g/mol (massa desacetilada)}$$

$$M_a = 221.21 \text{ g/mol (massa acetilada)}$$

$$336.000 = 179.17x + 221.21y$$

$$336.000 = 179.17 \cdot (2.4483y) + 221.21y$$

$$y = 509.2$$

$$x = 1246.6$$

$$x = 5$$

$n(\text{qui}) = \frac{m(\text{qui})}{M_v(\text{qui})} = \frac{0.25}{336000} = 7.44 \cdot 10^{-7} \text{ mol}$	$n(\text{TPP}) = \frac{m(\text{TPP})}{M(\text{TPP})} = \frac{0.0625}{367.86} = 1.69 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$
$n(\text{NH}_2) = x \cdot n(\text{qui}) = 9.27 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$	$n(\text{OH}) = x \cdot n(\text{TPP}) = 8.49 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$
$P/\text{pH} = 3.5, \alpha = 1 \text{ [112]}$	$P/\text{pH} = 5.0, \alpha = 0.6 \text{ [112]}$
$n(\text{NH}_3^+) = \alpha \cdot n(\text{NH}_2)$	$n(\text{O}^-) = \alpha \cdot n(\text{OH})$
$n(\text{NH}_3^+) = 9.27 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$	$n(\text{O}^-) = 5.09 \cdot 10^{-4} \text{ mol}$

$$n(\text{NH}_3^+) : n(\text{O}^-) \approx 1.8 : 1$$

APÊNDICE C

Neste apêndice são apresentadas as curvas de queda de pressão em função da velocidade do fluxo de ar. O coeficiente angular de cada curva foi utilizado para determinar o coeficiente de permeabilidade Darciana (k_1)

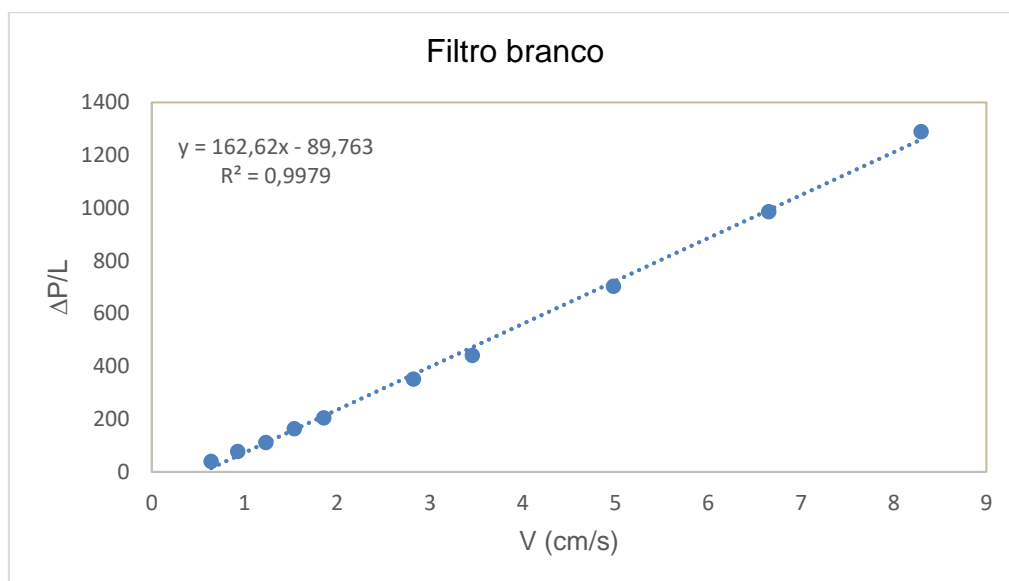


Figura C.1 - Curva de queda de pressão sobre a espessura do filtro *versus* velocidade do fluxo de ar do filtro comercial branco.

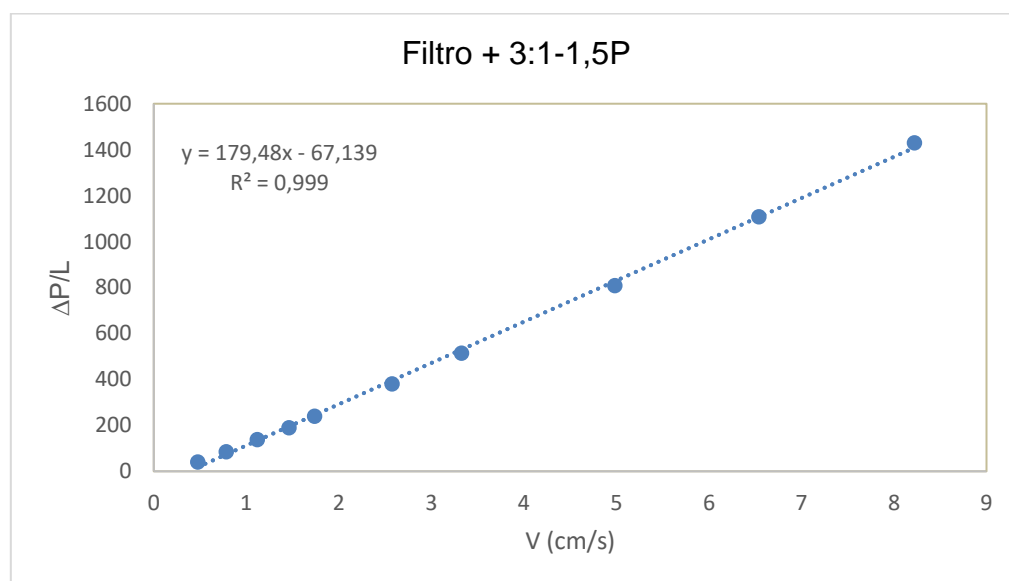


Figura C.2 - Curva de queda de pressão sobre a espessura do filtro *versus* velocidade do fluxo de ar do filtro comercial modificado com NPs 3:1-1,5P.

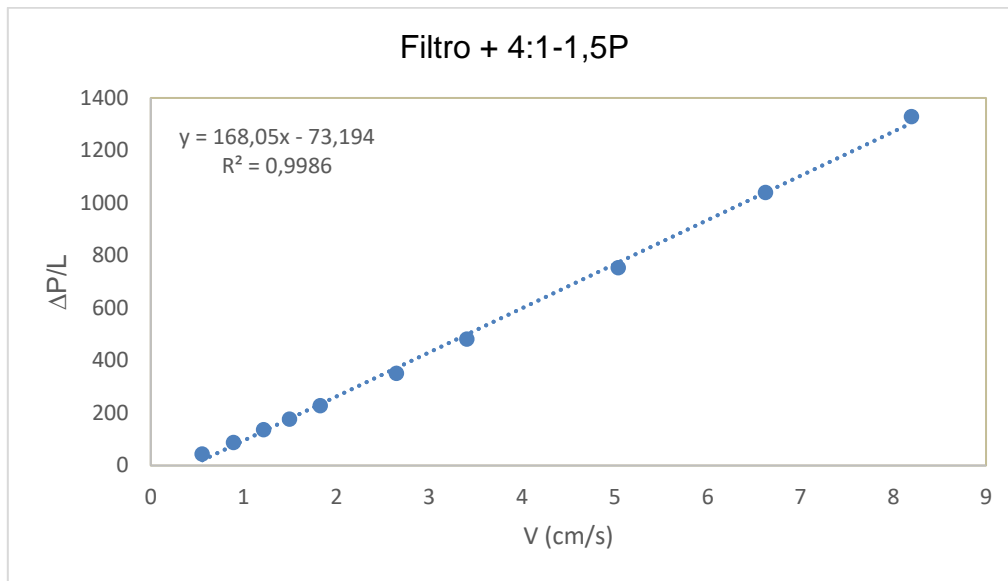


Figura C.3 - Curva de queda de pressão sobre a espessura do filtro versus velocidade do fluxo de ar do filtro comercial modificado com NPs 4:1-1,5P.